



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS  
Y FORESTALES**

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

**“EL EFECTO DEL FOTOPERIODO EN EL  
CRECIMIENTO, ALIMENTACIÓN Y DETERMINACIÓN  
SEXUAL DEL PEZ BLANCO DE PÁTZCUARO  
*Chirostoma estor* (JORDAN, 1880)”**

## **TESIS**

**PRESENTA:**

**M. en C. GUILLERMO ARMANDO CORONA HERRERA**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ASESOR:**

**DR. CARLOS ANTONIO MARTÍNEZ PALACIOS**

**COASESOR:**

**DR. CARLOS CRISTIAN MARTÍNEZ CHÁVEZ**



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE  
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



INSTITUTO DE  
INVESTIGACIONES  
AGROPECUARIAS  
Y FORESTALES

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS  
Y FORESTALES**

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

**“EL EFECTO DEL FOTOPERIODO EN EL  
CRECIMIENTO, ALIMENTACIÓN Y DETERMINACIÓN  
SEXUAL DEL PEZ BLANCO DE PÁTZCUARO  
*Chirostoma estor* (JORDAN, 1880)”**

# **TESIS**

***PRESENTA:***

**M. en C. GUILLERMO ARMANDO CORONA HERRERA**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

***COMITÉ DE TUTORES:***

**DR. CARLOS ANTONIO MARTÍNEZ PALACIOS  
DR. CARLOS CRISTIAN MARTÍNEZ CHÁVEZ  
DRA. ELVA MAYRA TOLEDO CUEVAS  
DR. JUAN JOSÉ VALDEZ ALARCÓN  
DRA. SILVIA EDA ARRANZ RICHIGER**

**MORELIA, MICHOACÁN**

**DICIEMBRE 2017**



<b>Índice general</b>		<b>Pag</b>
I.	Resumen	1
II.	Abstract	2
III.	Agradecimientos	3
IV	Estructura de la tesis	4
V.	Introducción general	4
VI.	Hipótesis general	8
VII.	Objetivos	8
VIII.	Estrategia experimental	8
1 .	Capítulo 1. El fotoperiodo y los ritmos circadianos: una adaptación evolutiva al estrés oxidativo	10
1.1.	Ritmos biológicos y estrés oxidativo: respuestas ancestrales coevolutivas a variaciones lumínicas	10
1.2.	Percepción biológica de las variaciones lumínicas circadianas	16
1.3.	Osciladores biológicos: control transcripcional-traduccional de los ritmos circadianos	22
1.4.	Interacciones entre los osciladores biológicos y el estrés oxidativo	27
1.5.	Bibliografía	34
2 .	Capítulo 2. El efecto del fotoperiodo sobre la determinación sexual del pez blanco de pátzcuaro <i>Chirostoma estor</i>	48
2.1.	Introducción	49
2.1.1.	Determinación sexual en peces teleósteos	49
2.1.2.	Diferenciación sexual en peces teleósteos	51
2.1.3.	Influencia del fotoperiodo en la determinación sexual de animales acuáticos	53
2.1.4.	Determinación/diferenciación sexual, estrés y estrés oxidativo en peces	54
2.1.5.	Relaciones entre el eje de estrés y el estrés oxidativo en peces	57
2.2.	Materiales y Métodos	61
2.2.1.	Condiciones experimentales	61
2.2.2.	Análisis histológico de las gonádas y descripción fenotípica del sexo	62
2.2.3.	Cuantificación relativa por qPCR en tiempo real	62
2.2.4.	Análisis estadísticos	66
2.3.	Resultados	66
2.3.1.	Desarrollo gonádico y tasa sexual fenotípica	66
2.3.2.	Expresión relativa de los genes de diferenciación sexual	67
2.3.3.	Expresión relativa de los genes relacionados al eje de estrés y estrés oxidativo	68
2.4.	Discusiones y conclusiones	69
2.5.	Bibliografía	75
3 .	Capítulo 3. El efecto del fotoperiodo sobre las	88



	características biométricas de crecimiento, el consumo de alimento, la supervivencia y la expresión de genes en <i>Chirostoma estor</i>	
<b>3.1.</b>	<b>Introducción</b>	<b>89</b>
<b>3.1.1.</b>	La luz y su efectos sobre el crecimiento, alimentación y supervivencia en peces teleósteos	<b>89</b>
<b>3.1.2.</b>	El efecto de la luz sobre los ritmos circadianos de melatonina y cortisol en peces teleósteos	<b>94</b>
<b>3.1.3.</b>	Sistemas redox: un enfoque integral de investigación en vertebrados	<b>99</b>
<b>3.2.</b>	<b>Materiales y Métodos</b>	<b>100</b>
<b>3.2.1.</b>	Condiciones experimentales	<b>100</b>
<b>3.2.2.</b>	Análisis biométricos de crecimiento, consumo de alimento y supervivencia	<b>101</b>
<b>3.2.3.</b>	Determinación de niveles de las hormonas circadianas: melatonina y cortisol	<b>102</b>
<b>3.2.4.</b>	Análisis de expresión de genes por secuenciación masiva RNA-seq	<b>105</b>
<b>3.2.4.1.</b>	Secueciación masiva RNA-seq	<b>105</b>
<b>3.2.4.2.</b>	Procesos de ensamble y anotación funcional del transcriptoma <i>De Novo</i>	<b>106</b>
<b>3.2.4.3.</b>	Procesamiento e identificación de transcritos diferencialmente expresados	<b>108</b>
<b>3.2.4.4.</b>	Análisis de enriquecimiento e identificación de procesos biológicos y rutas metabólicas	<b>110</b>
<b>3.3.</b>	<b>Resultados</b>	<b>111</b>
<b>3.3.1.</b>	Análisis biométricos de crecimiento, consumo de alimento y supervivencia	<b>111</b>
<b>3.3.2.</b>	Determinación del nivel de las hormonas circadianas: melatonina y cortisol	<b>115</b>
<b>3.3.3.</b>	Análisis de expresión de genes por secuenciación masiva RNA-seq	<b>116</b>
<b>3.3.3.1.</b>	Ensamble y anotación funcional del transcriptoma <i>De Novo</i>	<b>116</b>
<b>3.3.3.2.</b>	Análisis y anotación de transcritos diferencialmente expresados	<b>124</b>
<b>3.3.3.3.</b>	Análisis de enriquecimiento e identificación de procesos biológicos de genes/proteínas diferencialmente expresadas	<b>140</b>
<b>3.4.</b>	<b>Discusiones y conclusiones</b>	<b>159</b>
<b>3.4.1.</b>	Crecimiento, consumo de alimento y supervivencia en condiciones de luz continua	<b>159</b>
<b>3.4.2.</b>	Niveles de las hormonas circadianas: melatonina y cortisol en condiciones de luz continua	<b>162</b>
<b>3.4.3.</b>	Análisis de expresión de genes por secuenciación masiva RNA-seq	<b>164</b>
<b>3.4.3.1.</b>	Ensamble y anotación funcional del transcriptoma <i>De</i>	<b>164</b>



	<i>Novo</i>	
3.4.3.2.	Análisis de anotación, enriquecimiento e identificación de procesos biológicos de transcritos diferencialmente expresados en condiciones de luz continua	167
3.5.	Bibliografía	177
4.	Discusiones y conclusiones generales	194
Apéndice A.	Perfil metabolómico cualitativo y cuantitativo por resonancia magnética nuclear del pez blanco de Pátzcuaro <i>Chirostoma estor</i>	202
A1.	Metodología para la obtención de metabolitos y análisis de resonancia magnética nuclear	202
A2.	Resultados de los análisis de resonancia magnética nuclear	205
A3.	Bibliografía	216
Apéndice B.	Secuenciación Genómica De Novo del pez blanco de Pátzcuaro <i>Chirostoma estor</i>	216
B1.	Metodología de extracción de ADN y secuenciación masiva (DNA-seq)	216
B2.	Resultados de secuenciación genómica masiva (DNA-seq)	217
B3.	Bibliografía	218

	<b>Índice de figuras</b>	<b>Pag</b>
Figura 1.	Estrategia experimental desarrollada para la evaluación del efecto del fotoperiodo en el crecimiento, alimentación y determinación sexual del pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	9
Figura 2.	Reactivación cíclica de Peroxiredoxina III (PrxIII) en el control de las oscilaciones redox mitocondriales	14
Figura 3.	Vínculo entre los relojes circadianos y la homeostasis redox	15
Figura 4.	Posible ruta del daño celular en células fotorreceptoras retinales 661-W	21
Figura 5.	Red circadiana transcripcional en mamíferos	26
Figura 6.	Principales funciones de los nucleótidos (NAD, NADP) como transportadores de electrones y señalizadores biológicos	31
Figura 7.	Las sirtuinas vinculan los ritmos circadianos y el metabolismo	33
Figura 8.	Espectro de tubos T8-LED, luz fría (6500K) obtenida con el espectrómetro USB2000+VIS-NIR Ocean Optics Spectrometer	62
Figura 9.	Curvas derivativas y temperaturas de melting de los oligonucleótidos utilizados en el experimento, incluyendo controles negativos	65
Figura 10.	Análisis de estabilidad de los genes de referencia calculados con el software ReFinder	65
Figura 11.	Desarrollo gonádico en organismos bajo fotoperiodo simulado control y en el fotoperiodo de luz continua	67



<b>Figura 12.</b>	Expresión relativa individual (log2) de los transcritos relacionados con la diferenciación sexual <i>sox9</i> y <i>foxl3</i>	<b>68</b>
<b>Figura 13.</b>	Expresión relativa de los transcritos relacionados al estrés oxidativo <i>Catalasa (cat)</i> , <i>Superóxido dismutasa 2 (sod2)</i> , <i>Glutación reductasa (gsr)</i> , <i>Proteína desacoplante 2 (ucp2)</i> y activación del eje de estrés <i>Factor liberador de corticotropina (crf)</i> y <i>receptor de glucocorticoide 1 (gcr1)</i>	<b>69</b>
<b>Figura 14.</b>	Interrelación de los sistemas redox en los diferentes niveles biológicos	<b>100</b>
<b>Figura 15.</b>	Concentraciones de melatonina con el análisis de regresión logística 5 PL-1/y3	<b>103</b>
<b>Figura 16.</b>	Paralelismo de la curva estándar del kit de melatonina (Curva estándar) y la dilución relativa de muestras de pez blanco (Cuerpo <i>C. estor</i> )	<b>104</b>
<b>Figura 17.</b>	Secuencia de pasos para la preparación de librerías y secuenciación masiva de RNA-seq, a partir de RNA extraído de las cabezas de <i>C. estor</i>	<b>105</b>
<b>Figura 18.</b>	Algoritmos utilizados por el programa bioinformático Trinity a partir de las lecturas fastq-RF, para ensamblar los transcritos expresados en el pez blanco <i>C. estor</i>	<b>106</b>
<b>Figura 19.</b>	Programas bioinformáticos y bases de datos para traducir transcritos, identificar y realizar la anotación funcional de proteínas a partir de los transcritos ensamblados en el pez blanco <i>C. estor</i>	<b>107</b>
<b>Figura 20.</b>	Secuencia de pasos para la estimación de la abundancia y matrices de expresión FPKM de los transcritos del pez blanco <i>C. estor</i>	<b>109</b>
<b>Figura 21.</b>	Pasos para la obtención de genes diferencialmente expresados (DE) a partir de las matrices de expresión FPKM de los transcritos del pez blanco <i>C. estor</i>	<b>110</b>
<b>Figura 22.</b>	Resumen gráfico del proceso utilizado en el análisis transcriptómico <i>De Novo</i> , expresión diferencial, análisis de enriquecimiento e identificación de procesos biológicos y rutas metabólicas del pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	<b>111</b>
<b>Figura 23.</b>	Relación masa-longitud (RML) de los organismos de los fotoperiodos de luz continua (CL) y simulado control (CS) a las 12 semanas post-eclosión (SPE)	<b>113</b>
<b>Figura 24.</b>	Análisis de supervivencia de los organismos en fotoperiodos de luz continua (CL) y simulado control (CS) al momento de la eclosión, 4 y 12 semanas post-eclosión (SPE)	<b>114</b>
<b>Figura 25.</b>	Fenotipos observados en el tratamiento de luz continua (CL) a las 12 semanas post-eclosión (SPE)	<b>114</b>
<b>Figura 26.</b>	Concentración de la hormona circadiana de cortisol de los organismos en fotoperiodos de luz continua (CL) y simulado control (CS) de 12 semanas post-eclosión (SPE)	<b>116</b>
<b>Figura 27.</b>	Electroferograma de RNA extraído de cabezas del pez blanco ( <i>C. estor</i> ) utilizados para secuenciación masiva	<b>116</b>



	RNAseq	
<b>Figura 28.</b>	Diagrama de Venn de los transcritos anotados en el pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	<b>118</b>
<b>Figura 29.</b>	Diagrama de distribución de transcritos anotados para el pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i> de acuerdo al género de otras especies de la base de datos de BLAST-NCBI	<b>119</b>
<b>Figura 30.</b>	Diagrama porcentual de los procesos biológicos identificados en el análisis de enriquecimiento en términos de GO para el pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	<b>120</b>
<b>Figura 31.</b>	Diagrama porcentual de las funciones moleculares identificadas en el análisis de enriquecimiento en términos de GO para el pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	<b>120</b>
<b>Figura 32.</b>	Diagrama porcentual de los componentes celulares identificados en el análisis de enriquecimiento en términos de GO para el pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	<b>121</b>
<b>Figura 33.</b>	Diagrama de las rutas metabólicas primarias identificadas respecto a la base de datos de Kegg para el pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	<b>122</b>
<b>Figura 34.</b>	Diagrama de las rutas metabólicas secundarias identificadas respecto a la base de datos de Kegg para el pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	<b>123</b>
<b>Figura 35.</b>	Diagrama de Venn de los transcritos diferencialmente expresados con los programa RSEM y eXpress para el pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	<b>124</b>
<b>Figura 36.</b>	Gráfica de Escalamiento multidimensional (MDS) de los transcritos diferencialmente expresados para el pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	<b>127</b>
<b>Figura 37.</b>	Gráfica tipo heatmap de los niveles de expresión (log <sub>2</sub> ) de los transcritos ambiguos y no anotados diferencialmente expresados en el pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	<b>135</b>
<b>Figura 38.</b>	Gráfica tipo heatmap de los niveles de expresión (log <sub>2</sub> ) de los transcritos anotados diferencialmente expresados en el pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	<b>136</b>
<b>Figura 39.</b>	Matriz de correlación de los niveles de expresión (log <sub>2</sub> ) de los transcritos diferencialmente expresados entre las muestras del pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	<b>137</b>
<b>Figura 40.</b>	Matriz de correlación de los niveles de expresión (log <sub>2</sub> ) de los transcritos ambiguos y no anotados diferencialmente expresados en las muestras del pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	<b>138</b>
<b>Figura 41.</b>	Matriz de correlación de los niveles de expresión (log <sub>2</sub> ) de los transcritos anotados diferencialmente expresados en las muestras del pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	<b>139</b>
<b>Figura 42.</b>	Análisis de interacción proteína-proteína de los transcritos anotados diferencialmente expresados en las muestras del pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	<b>140</b>
<b>Figura 43.</b>	Diagrama del ciclo de vesículas sinápticas regulado	<b>149</b>



	negativamente en condiciones de luz continua para el pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	
<b>Figura 44.</b>	Diagrama del metabolismo de purinas regulado negativamente en condiciones de luz continua para el pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	<b>151</b>
<b>Figura 45.</b>	Diagrama del proceso de fototransducción regulado negativamente en condiciones de luz continua para el pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	<b>153</b>
<b>Figura 46.</b>	Proceso de extracción de metabolitos por el método de Metanol:Cloroformo:Agua para análisis de resonancia magnética nuclear en el pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	<b>203</b>
<b>Figura 47.</b>	Espectro 1H-1D NMR con análisis de picos espectrales e integrales del disolvente de buffer de fosfatos y agua deuterizada (D2O) utilizado como disolvente en las muestras del pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	<b>205</b>
<b>Figura 48.</b>	Espectros 1H-1D NMR con análisis de picos espectrales e integrales en el pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	<b>206</b>
<b>Figura 49.</b>	Comparación cualitativa de espectros 1H-1D NMR en el pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	<b>207</b>
<b>Figura 50.</b>	Análisis de componentes principales (PCA) de los niveles de intensidad de picos espectrales 1H1D NMR en muestras de fotoperiodo simulado control (CS) y las muestras del fotoperiodo de luz continua (CL) en el pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	<b>209</b>
<b>Figura 51.</b>	Análisis de correlación de los picos espectrales 1H1D NMR en las muestras de fotoperiodo simulado control (CS) y las muestras del fotoperiodo de luz continua (CL) en el pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	<b>211</b>
<b>Figura 52.</b>	Cambios químicos espectrales (ppm) para experimentos 1H1D NMR referenciados a TMS (Tetrametilsilano)	<b>211</b>
<b>Figura 53.</b>	Gráfica de los niveles de intensidad de los picos espectrales 1H-1D NMR en las muestras de fotoperiodo simulado control (CS) y las muestras del fotoperiodo de luz continua (CL) en el pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	<b>212</b>
<b>Figura 54.</b>	Comparación cualitativa de espectros COSY(1H-2D) NMR en el pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	<b>214</b>
<b>Figura 55.</b>	Espectro HSQC (1H-13C) NMR en las muestras del pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	<b>215</b>
<b>Figura 56.</b>	Distribución de la calidad de las lecturas obtenidas de la secuenciación del DNAg en el pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	<b>217</b>
	<b>Índice de tablas</b>	<b>Pag</b>
<b>Tabla 1.</b>	Secuencias, porcentajes de eficiencia de amplificación, coeficientes de determinación longitud de amplicones y temperaturas de hibridación de los oligonucleótidos usados	<b>64</b>



	en este trabajo	
<b>Tabla 2.</b>	Principales procesos bioinformáticos utilizados para el análisis transcriptómico De Novo en el pez blanco <i>C. estor</i>	<b>108</b>
<b>Tabla 3.</b>	Principales procesos bioinformáticos utilizados para la identificación de los transcritos diferencialmente expresados en el pez blanco <i>C. estor</i>	<b>109</b>
<b>Tabla 4.</b>	Masa corporal (miligramos) y Longitud estándar (milímetros) de los organismos mantenidos en los fotoperiodos de luz continua (CL) y simulado control (CS) en los puntos de muestreo de 0, 4, 8 y 12 semanas post-eclosión (SPE)	<b>112</b>
<b>Tabla 5.</b>	Factor de condición (K) y Tasa de crecimiento específico (TCE) de los organismos en fotoperiodos de luz continua (CL) y simulado control (CS)	<b>113</b>
<b>Tabla 6.</b>	Concentración de melatonina de los organismos en fotoperiodos de luz continua (CL) y simulado control (CS) de 12 semanas post-eclosión (SPE)	<b>115</b>
<b>Tabla 7.</b>	Estadística de alineamiento de muestras vs ensamble De Novo para el pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i> . RF (Reverse-Forward), FR (Forward-Reverse)	<b>117</b>
<b>Tabla 8.</b>	Expresión normalizada de transcritos para el pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i> . FPKM (Total de fragmentos del transcritos / millones de lecturas mapeadas por cada kilobase de longitud efectiva del transcritos)	<b>119</b>
<b>Tabla 9.</b>	Valores de expresión diferencial de los transcritos de alta expresión en el fotoperiodo de luz continua (CL) para el pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	<b>125</b>
<b>Tabla 10.</b>	Valores de expresión diferencial de los transcritos de alta expresión en el fotoperiodo simulado control (CS) para el pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	<b>126</b>
<b>Tabla 11.</b>	Porcentajes de anotación de transcritos diferencialmente expresados para el pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	<b>127</b>
<b>Tabla 12.</b>	Transcritos de alta expresión anotados en el fotoperiodo de luz continua (CS) para el pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	<b>128</b>
<b>Tabla 13.</b>	Transcritos de alta expresión anotados en el fotoperiodo de luz continua (CL) para el pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	<b>130</b>
<b>Tabla 14.</b>	Transcritos diferencialmente expresados con anotación ambigua en el pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	<b>131</b>
<b>Tabla 15.</b>	Transcritos no anotados diferencialmente expresados en el pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	<b>133</b>
<b>Tabla 16.</b>	Análisis de enriquecimiento en términos de GO (Gene ontology) y procesos biológicos de Kegg de los genes/proteínas diferencialmente expresados en el pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	<b>142</b>
<b>Tabla 17.</b>	Resumen de principales funciones conocidas de los genes/proteínas diferencialmente expresados en el pez	<b>145</b>



<b>Tabla 18.</b>	blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i> Procesos biológicos de genes/proteínas con alta expresión en el tratamiento de fotoperiodo simulado control (CS) en el pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	<b>155</b>
<b>Tabla 19.</b>	Procesos biológicos de genes/proteínas con alta expresión en el tratamiento de luz continua (CL) en el pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	<b>158</b>
<b>Tabla 20.</b>	Comparación de valores obtenidos en transcriptomas De Novo de peces vs transcriptoma De Novo en <i>C. estor</i>	<b>165</b>
<b>Tabla 21.</b>	Procesos biológicos relacionados con el transcriptoma de <i>C. estor</i> y diferencialmente reguladas por el efecto de la luz en peces	<b>170</b>
<b>Tabla 22.</b>	Valores de intensidad de los picos espectrales 1H-1D NMR utilizados para el análisis estadístico cuantitativo en el pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	<b>208</b>
<b>Tabla 23.</b>	Valores de presencia diferencial cuantitativa de los picos espectrales 1H-1D NMR en el pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	<b>210</b>
<b>Tabla 24.</b>	Picos espectrales COSY 1H-2D con presencia única en las muestras de fotoperiodo simulado control (CS) y las muestras del fotoperiodo de luz continua (CL) en el pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	<b>213</b>
<b>Tabla 25.</b>	Resumen de la corrida de secuenciación para el DNAg del pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>	<b>218</b>



## I. RESUMEN

El uso del fotoperiodo de luz continua es común en la acuicultura de teleósteos, sin embargo los mecanismos moleculares que modulan el crecimiento, la alimentación y la determinación sexual no son bien comprendidos. En este trabajo se analizan algunos elementos de respuesta en: a) Fotoperiodo de luz continua (CL) y b) Fotoperiodo simulado control (CS); aplicados desde la fertilización y hasta las 12 semanas de eclosión en *Chirostoma estor*. Al final del experimento se identificaron histológicamente las proporciones sexuales, además se obtuvieron las variables biométricas, de alimentación, perfiles de hormonas circadianas y análisis de expresión de genes por qPCR y secuenciación masiva RNA-seq. En CS se observó un 40% de machos vs CL con 73.3% de machos ( $p \leq 0.05$ ). Los análisis por qPCR indican que en CL el 64.29% de los individuos presentan una tendencia de mayor expresión de *sox9* (diferenciación testicular) vs *foxl2* (diferenciación ovárica), comparado con el 35.71% en CS ( $p > 0.05$ ). La expresión de genes asociados al estrés oxidativo (*sod2* y *ucp2*) y la respuesta del eje de estrés (*gcr1*) no muestran diferencias significativas entre CS y CL ( $p > 0.05$ ). Los niveles transcripcionales de enzimas asociadas a la defensa ante el estrés oxidativo (*cat* y *gsr*) y en la activación del eje de estrés (*crf*) presentan diferencias significativas entre CL y CS ( $p \leq 0.05$ ). Los organismos de CL presentaron un mayor crecimiento (masa, 66.14% y longitud, 17.95%) vs CS y un mejor factor de conversión alimenticia (1.618 en CL vs 1.95 en CS) ( $p \leq 0.05$ ); sin diferencias significativas en la supervivencia, ni el factor de condición ( $p > 0.05$ ). Los perfiles de cortisol revelan diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ), pero no para la producción de melatonina ( $p > 0.05$ ) entre tratamientos. El análisis transcriptómico *De Novo* en *C. estor*, indica que 68,960 contigs se anotaron en 43,314 proteínas. El análisis de enriquecimiento en términos de GO muestra 126,929 términos de procesos biológicos, 98,712 de componentes celulares y 36,670 de función molecular. El análisis Kegg revela 791 anotaciones de los genes en rutas metabólicas primarias, 224 en rutas secundarias y 383 rutas biológicas identificadas. El análisis de expresión diferencial indica 169 transcriptos diferencialmente expresados ( $p \leq 0.05$ ) entre tratamientos. En conjunto las evidencias moleculares e histológicas demuestran que la luz continua determina sexualmente a *C. estor* y es la primer evidencia experimental que liga la masculinización y el estrés oxidativo en un pez teleósteo. En el transcriptoma los genes diferencialmente expresados se relacionan con la fototransducción, sinapsis, metabolismo, estrés oxidativo, ritmos circadianos, crecimiento y respuesta inmune, entre otros que permiten crecer y sobrevivir a los organismos bajo condiciones de iluminación constante. Las evidencias sugieren un claro efecto de la luz continua sobre el crecimiento, alimentación y determinación sexual en *C. estor*, lo que contribuye al conocimiento de los mecanismos moleculares que son regulados por la luz en teleósteos, además de proveer de herramientas moleculares de alta calidad para el desarrollo de futuros trabajos en esta especie de importancia económica, cultural y ambiental del altiplano mexicano.

Palabras Clave: Luz, Ritmos biológicos, Estrés oxidativo, Plasticidad, Transcriptómica



## II. ABSTRACT

The use of continuous lighting is an increasingly common practice in teleost aquaculture, however the molecular interplays that modulate the growth, the feeding and the sex determination in fish are not well understood. The aim of this work is analyze the biological responses under: a) Continuous lighting photoperiod (CL) and b) Control simulated photoperiod (CS), which were applied after egg fertilization until 12 weeks after hatching. At the end of the trial the sex ratios, biometrics, feeding, circadian hormones profiles and gene expression (qPCR and RNA-seq) analyses were performed. We observed 40% of males in CS vs 73.3% of males in CL ( $p \leq 0.05$ ). The qPCR analyses indicate that 64.29% of CL individuals had a higher expression tendency of *sox9* (testicular differentiation) vs *foxl2* (ovarian differentiation), comparing with 35.71% in CS ( $p > 0.05$ ). The gene expression of oxidative stress biomarkers (*sod2* and *ucp2*) and stress response (*gcr1*), did not show statistical differences between treatments ( $p > 0.05$ ). However the transcripts of enzymes against oxidative stress (*cat* and *gsr*) and the activation of stress axis (*crf*) shows overexpression in CL ( $p \leq 0.05$ ). The fish of CL had an overgrowth (mass 66.14% and length 17.95% vs CS) and better feed conversion ratio 1.618 vs 1.95 in CS ( $p \leq 0.05$ ). With no statistical differences in survival and condition factor ( $p > 0.05$ ). The transcriptomic *De Novo* assembly indicates the presence of 68,960 contigs annotated in 43,314 proteins. The GO enrichment analysis indicates 126,929 terms of biological processes, 98,712 terms of cellular components and 36,670 terms of molecular function. The Kegg pathway mapping analysis reports 791 and 224 annotations in primary and secondary metabolic routes respectively, also 383 biological routes identified. The differential gene expression analyzes found 169 transcripts differentially expressed between treatments ( $p \leq 0.05$ ). The molecular and histological evidences demonstrate that continuous light influence the sex determination in *C. estor* and is the first experimental evidence bounding the oxidative stress and masculinization for a teleost fish. The differentially expressed genes are related to phototransduction, synapses, metabolism, oxidative stress, circadian rhythms, growth and immune response among others, which allow the overgrowth and survival under continuous illumination conditions. All these evidences suggest a clear and strong effect in growth, feeding and sex determination by continuous illumination in *C. estor*. Increasing our knowledge in the molecular mechanisms influenced by light in teleost and vertebrates. Finally, this work supplies high quality molecular tools for future studies in this species with high economic, cultural and environmental value.

Keywords: Light, Biological Rhythms, Oxidative stress, Plasticity, Transcriptomics



### III. AGRADECIMIENTOS

Durante el desarrollo de esta tesis de doctorado he compartido bastantes momentos con mi hija Tsanda, que ha sufrido y disfrutado conmigo desde la fase experimental hasta la escritura final de este documento. Tsanda ha sido el motor principal que me impulsa a seguir adelante todos los días y que a pesar de los diversos problemas que se nos han presentado, hemos salido adelante juntos. Este trabajo se lo dedico a ella, esperando que algún día también cumpla sus sueños y lo que se proponga en su vida.

Agradezco infinitamente a mi familia nuclear, mi papá Armando, mi mamá Florina y mi hermana Flor, que siempre hemos estado unidos y pendientes unos de los otros. Manteniendo a la familia unida y compartiendo muchos bellos momentos en esta vida, que sin duda han logrado crear vínculos muy fuertes entre nosotros. Así como a mi abuelo Braulio que falleció hace poco tiempo y que me enseñó que cuando haces tu trabajo con pasión todo se puede lograr.

También quiero agradecerle a mi novia Frida que ha compartido conmigo sueños y experiencias inolvidables que durante dos años nos han llevado a conocernos, amarnos y comprendernos más cada día. A ella le dedico también esta tesis, esperando que la inspire para seguir en su camino académico. Además agradezco a su familia María Elena, Rubén, Miriam, Balam y Ema por su gran cariño y apoyo en todo momento para alcanzar nuestras metas.

Quiero decir muchísimas gracias a mi asesor el Dr. Carlos Martínez Palacios y a mi coasesor el Dr. Cristian Martínez Chávez, los cuales me han brindado su plena confianza y apoyo para el desarrollo de este trabajo de doctorado. Además agradezco a mis sinodales, la Dra. Mayra Toledo Cuevas, la Dra. Silvia Arranz y el Dr. Juan José Valdez Alarcón, que han aportado sus conocimientos para hacer críticas constructivas, orientándome en este arduo camino de la investigación científica.

Deseo agradecer a los investigadores del IIAF, la Dra. Gisela Ríos Durán, el Dr. Jorge Fonseca Madrigal y los técnicos del laboratorio M. en C. Jesús López, la Biol. Lupita Cortés y la M. en C. Sibila Santos que me han brindado siempre su apoyo y amistad sincera para la realización de este trabajo de tesis.

De manera especial agradezco al CONACYT por otorgarme la beca para la realización de este trabajo de doctorado, así como a Global Affairs Canada, por brindarme la beca "Emerging Leaders of the Americas", para realizar una estancia en el laboratorio de la Dra. Helene Volkoff de la Memorial University, la cual me brindo todo el apoyo profesional y personal para efectuar los estudios metabólicos presentados en esta tesis.

Además quiero agradecer a los investigadores y técnicos de la unidad universitaria de apoyo bioinformático del IBT-UNAM, los Doctores Alejandro



Sánchez, Ricardo Grande, Leticia Vega, Alejandra Escobar y Katy Sánchez; los M en C. Verónica Jimenez y Jerome Verleyen, así como al Lic. Karel Estrada por haberme brindado su amistad y apoyo para la realización de los análisis bioinformáticos presentados en este trabajo.

Agradezco a la Dra. Eliana Zelada de la Universidad Nacional del Santa del Perú y a la Dra. Tatiana Mira de la Universidad de los Llanos Colombianos, por brindarme su gran amistad durante todos estos años y haberme dado la oportunidad de dictar conferencias magistrales en sus respectivas universidades, que han enriquecido mi formación personal y profesional.

Finalmente agradezco a todos mis amigos y compañeros de vida que han compartido momentos importantes y me han apoyado para el cumplimiento de los objetivos propuestos en mi desarrollo profesional y humano.

#### **IV. ESTRUCTURA DE LA TESIS**

El presente trabajo de tesis se encuentra organizado en una primera sección donde se encuentra la introducción general, la hipótesis, los objetivos y la estrategia experimental. Posteriormente se presentan tres capítulos principales, una sección de discusiones y conclusiones generales, para finalizar con dos apéndices.

El primer capítulo es una recopilación general del vínculo entre el fotoperiodo y los ritmos circadianos. En el segundo capítulo se observa el trabajo realizado para determinar el efecto del fotoperiodo en la determinación sexual del pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*. En el tercer capítulo se compara el efecto del fotoperiodo sobre el crecimiento, el consumo de alimento, la supervivencia y la expresión de genes en juveniles de *C. estor*. Por último en la sección de apéndices se presentan resultados complementarios obtenidos de un análisis metabólico y una secuenciación genómica en *C. estor*.

#### **V. INTRODUCCIÓN GENERAL**

Los peces son el grupo más diverso de entre los vertebrados (Malmstrom *et al.*, 2016), ya que existen alrededor de 33,400 especies identificadas hasta la fecha (Fishbase, 2016) y entre estos registros los teleósteos agrupan a más de la mitad de las especies conocidas (Nelson, 2006). No obstante, muy pocas especies son conocidas, aunque representan modelos muy interesantes de investigación, pues poseen un gran número de estrategias fisiológicas en respuesta a los estímulos ambientales (Volkoff, 2016).

La mayoría de los estudios han sido realizados en las especies de interés comercial o científico y se han desarrollado principalmente por la creciente necesidad de entender a mayor profundidad el efecto que tienen las variables ambientales en las respuestas fisiológicas de los peces (Pitman *et al.*, 2013). El avance en la obtención de este conocimiento ha permitido desarrollar nuevos



enfoques biotecnológicos, que han derivado en el aumento de la producción acuícola a nivel mundial, la cual crece alrededor de 8% anualmente (FAO, 2016), mientras que las pesquerías se encuentran en su límite máximo sostenible o en plena reducción (Pauly y Zeller, 2016; MacKenzie *et al.*, 2016).

Esto resulta particularmente importante debido a que según las estadísticas mundiales la población global en el 2050 será de 9,600 millones de personas (Kobayashi *et al.*, 2015; FAO, 2016) y se requerirán alrededor de 113 millones de toneladas de proteína de origen animal para sustentar las necesidades alimenticias (Waite *et al.*, 2014). Debido a este contexto la acuicultura se plantea como una de las alternativas para poder suplir solo en parte, la necesidad de proteína de alta calidad para las generaciones futuras (Waite *et al.*, 2014; Kobayashi *et al.*, 2015; Froehlich *et al.*, 2017).

Para lograr este objetivo se deberá reducir la dependencia de harina de pescado para los alimentos destinados a la acuicultura e incrementar los niveles actuales de producción bajo enfoques sustentables intensivos (Searchinger *et al.*, 2014; FAO, 2016); por lo que se deben impulsar actividades de investigación y desarrollo biotecnológico que permitan solucionar estas problemáticas (Waite *et al.*, 2014; FAO, 2016).

Las actividades de investigación para conocer el efecto de la disponibilidad de oxígeno, de alimento, de temperatura y de fotoperiodo sobre el crecimiento, la alimentación y la reproducción de estos vertebrados acuáticos, (Pörtner y Farrell 2008; Volkoff *et al.*, 2010; Pitman *et al.*, 2013; Chrétien y Chapman, 2016; Kim *et al.*, 2016<sup>a</sup>; Volkoff, 2016; Comte y Olden, 2017; Kwasek *et al.*, 2017; Espigares *et al.*, 2017; Poletto *et al.*, 2017; Isorna *et al.*, 2017); proporcionan información básica que puede ser aplicada para desarrollar nuevos paquetes biotecnológicos que incrementen la producción acuícola sustentable en las especies de interés y así obtener la fuente proteica que se requiere para los años venideros.

El fotoperiodo (periodos de presencia/ausencia de luz) es uno de los factores ambientales que ejerce un potente control sobre los procesos fisiológicos en los peces (Isorna *et al.*, 2017). Se ha utilizado para incrementar la producción acuícola a nivel comercial en especies como la lubina Europea (*Dicentrarchus labrax*), el bacalao (*Gadus morhua*) y el salmón del Atlántico (*Salmo Salar*); En estas especies se han optimizado los tratamientos fotoperiódicos para retrasar el inicio de la maduración sexual, aumentar el crecimiento somático, regular la alimentación y controlar la reproducción (Endal *et al.*, 2000; Bromage *et al.*, 2001; Hansen *et al.*, 2001; Begtashi *et al.*, 2004; Nagasawa *et al.*, 2012; Korsøen *et al.*, 2013).

Recientemente en un Aterinópsido grunion de California (*Leuresthes tenuis*), se encontró que un fotoperiodo de 15 horas luz y 9 de obscuridad induce una mayor proporción de hembras (Brown *et al.*, 2014); constituyendo este el primer reporte donde el fotoperiodo puede incidir en la tasa de proporción sexual de



un vertebrado, lo que abre un panorama más amplio del efecto de la luz sobre la fisiología de los peces.

La etapa en la que los peces son expuestos a los diferentes fotoperiodos es de gran relevancia. En las fases tempranas de desarrollo se ha observado que existen cambios en el comportamiento y en la expresión de genes relacionados con los ritmos circadianos (ritmos biológicos que ocurren cada 24 horas); en pez cebra, *Danio rerio* (Di rosa *et al.*, 2015; Sovrano *et al.*, 2016), en el lenguado *Paralichthys olivaceus* (Mogi *et al.*, 2015) y en el lenguado de Senegal, *Solea senegalensis* (Martín-Robles *et al.*, 2012). Adicionalmente el fotoperiodo puede influenciar la tasa de eclosión larvaria (Blanco-Vives *et al.*, 2011). Además en la fase de embriogénesis la glándula pineal contribuye al desarrollo temprano del cerebro (Pitman *et al.*, 2013) y es la encargada de mediar las señales ambientales externas que lideran el crecimiento y el desarrollo de la larva esto indica que la luz es crucial en la fisiología de los peces desde estadios muy tempranos (Blanco-Vives *et al.*, 2010).

La actividad enzimática digestiva, el comportamiento alimenticio y los genes involucrados en los ritmos circadianos en la dorada, *Sparus aurata* también se ven influenciados por el fotoperiodo (Mata-Sotres *et al.*, 2015; Mata-Sotres *et al.*, 2016). De igual manera el fotoperiodo influye sobre el crecimiento y desarrollo del pez cebra (Villamizar *et al.*, 2014), además de inducir hiperplasia en células musculares del corvallo, *Umbrina cirrosa* (Ayala *et al.*, 2013). En conjunto estos reportes muestran la incidencia directa del fotoperiodo sobre el desarrollo de los peces durante la ontogenia temprana. Sin embargo aunque se han descrito los efectos del fotoperiodo, los mecanismos moleculares específicos por los que el fotoperiodo ejerce sus efectos estimulatorios son parcialmente desconocidos (Falcón *et al.*, 2007; Falcón *et al.*, 2010; Migaud *et al.*, 2010; Nagasawa *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2013; Nishiwaki-Ohkawa y Yoshimura, 2016; Maitra y Hassan, 2016; Isorna *et al.*, 2017).

Por lo anterior es necesario realizar estudios detallados en las especies de interés comercial o científico a nivel molecular, celular y biométrico durante la ontogenia de los organismos (Weger *et al.*, 2011; Pitman *et al.*, 2013; Bonasio, 2015; Sun *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2016<sup>b</sup>; Metzger y Schulte, 2016) para comprender a mayor profundidad los procesos que modulan la respuesta fisiológica ante la presencia de luz ambiental en los peces silvestres y cultivados (Weger *et al.* 2011, Ben Moshe *et al.*, 2014; Purushothaman *et al.*, 2015 Fujisawa *et al.*, 2016).

Para modificar el fotoperiodo en la acuicultura se han utilizado diferentes tipos de iluminación (fluorescente, aditivos metálicos, tungsteno, entre otros). Sin embargo en los últimos años se han utilizado nuevas tecnologías como los diodos emisores de luz o bien conocidos como LEDs (Shin *et al.*, 2014). Esto debido a que son más eficientes, económicos (Choi *et al.*, 2015) y emiten un amplio espectro de luz (420nm-650nm) que va desde el violeta hasta el rojo, que abarcan las longitudes de onda que se perciben como luz blanca.



Este tipo de iluminación LED se ha utilizado en experimentos para observar las respuestas biológicas relacionadas a la percepción fótica, el crecimiento, desarrollo, supervivencia, reproducción, estrés oxidativo y actividades rítmicas en especies como el salmón del Atlántico, *S. salar*, lubina Europea, *D. labrax*, damisela, *Chrysiptera cyanea*, brema de roca, *Oplegnathus fasciatus*, lenguado barfin, *Verasper moseri*, pez payaso, *Amphiprion clarkii*, pez cebra, *D. rerio* y pez dorado, *Carasius auratus* (Migaud *et al.*, 2007<sup>b</sup>; Villamizar *et al.*, 2009; Bapary *et al.*, 2011; Shin *et al.* 2011; Choi *et al.*, 2012; Shin *et al.*, 2014; Villamizar *et al.*, 2014; Choi *et al.*, 2015; Di rosa *et al.*, 2015; Jung *et al.*, 2016<sup>a,b</sup>; Choi *et al.*, 2016; Takahashi *et al.*, 2016).

En conjunto toda esta información sugiere que la manipulación del fotoperiodo y el uso de luces LEDs podría ser utilizada para modular el crecimiento, la alimentación y la determinación sexual en los peces, por lo que en el presente trabajo se proporcionan datos para evaluar su uso en el cultivo del pez blanco de Pátzcuaro *Chirostoma estor*.

Desde el año 1999 el grupo de acuicultura y biotecnología acuícola del IIAF-UMSNH ha desarrollado con éxito el cultivo del Aterinópsido *Chirostoma estor* (Martínez-Palacios *et al.*, 2006). Sin embargo se requiere de estudios profundos para optimizar el crecimiento, alimentación y reproducción de esta especie endémica en peligro de extinción. Especie que además presenta un alto valor social, económico, ambiental y cultural en el altiplano Mexicano (Ross *et al.*, 2006, Martínez-Palacios *et al.*, 2007).

El pez blanco además es interesante como modelo biológico para el estudio de las interacciones entre las variables ambientales con respecto a la alimentación, crecimiento y determinación sexual; ya que es un pez tropical con ancestros marinos y que actualmente habita en lagos endorreicos de agua dulce. Es un organismo carnívoro filtrador zooplanctóforo, agástrico de intestino corto que sintetiza y acumula hasta un 30% de ácidos grasos poliinsaturados (DHA) en su carne, además presenta reproducción asincrónica y determinación sexual por temperatura (Ross *et al.*, 2006, Martínez-Palacios *et al.*, 2007; Fonseca-Madrugal *et al.*, 2014; Corona-Herrera *et al.*, 2016).

Experimentos previos mostraron que el desempeño reproductivo de los Aterinópsidos *C. estor* y *C. humboltianum* es modulado significativamente por el uso de diferentes fotoperiodos (Blancas-Arroyo *et al.*, 2004; Martínez-Palacios *et al.*, 2007). Experimentos con luz continua fluorescente sugieren que estas condiciones de iluminación favorecen el incremento de la grasa abdominal y el crecimiento con un consecuente retraso de la madurez sexual en *C. estor* (Martínez-Chávez *et al.*, 2014).

Con base en estos antecedentes de respuesta a estímulos lumínicos para los peces en general y particularmente para *C. estor*, el presente trabajo pretende establecer algunas bases a nivel molecular, histológico y biométrico del efecto del fotoperiodo sobre el crecimiento, la alimentación y determinación sexual,



mediante el uso de iluminación LED de amplio espectro bajo dos fotoperiodos: a) fotoperiodo de luz continua (CL) 24L:0D y b) fotoperiodo simulado (CS) de 12 horas luz/12 oscuridad durante la fases tempranas de desarrollo y crecimiento del pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*.

La información generada en el presente trabajo servirá de base para el desarrollo de un paquete científico-tecnológico que permita incrementar los niveles de producción acuícola de esta especie de alto valor nutricional y coadyuvar a la seguridad alimentaria de generaciones presentes y futuras.

## VI. HIPÓTESIS GENERAL

El fotoperiodo de luz continua (24L:0D) con iluminación LED, aplicado durante las etapas tempranas de crecimiento funciona como un modulador del estado fisiológico general del pez blanco de Pátzcuaro (*C. estor*), lo que permite un incremento en la alimentación y el crecimiento, además de incidir en la determinación sexual, con respecto a organismos mantenidos en un fotoperiodo simulado control (12L:12D).

## VII. OBJETIVOS

### VII.I. Objetivo General

Evaluar el efecto del fotoperiodo en el crecimiento, la alimentación y la determinación sexual del pez blanco de Pátzcuaro *Chirostoma estor*.

### VII.II. Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto del fotoperiodo sobre la determinación sexual del pez blanco de Pátzcuaro *Chirostoma estor*.
2. Determinar el efecto del fotoperiodo sobre las características biométricas de crecimiento, el consumo de alimento, la supervivencia y la expresión de genes en juveniles de *Chirostoma estor*.

## VIII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

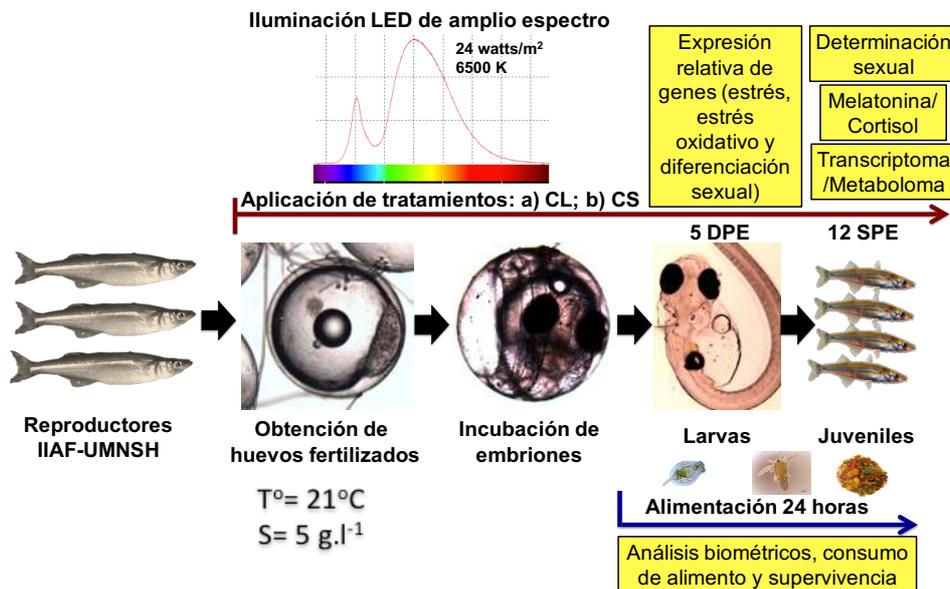
El experimento fue realizado en las instalaciones del Laboratorio Nacional de Nutrigenómica y Microbiómica Digestiva Animal, del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo en Morelia, México.

Los tratamientos de fotoperiodo a) Fotoperiodo simulado control (CS), 12 Luz: 12 Oscuridad y b) Fotoperiodo de luz continua (CL), 24 Luz: 0 Oscuridad, fueron controlados con un sistema automático (RadioRA2 LUTRON). La iluminación se proporcionó con una intensidad de 26.14 watts·m<sup>2</sup>, con lámparas T8-LED, de luz fría de 6500 K con amplio espectro (Figura 1). En el

experimento se obtuvieron alrededor de 2,250 huevos fertilizados provenientes de 6 parejas de reproductores de *C. estor*. Los huevos de todas las parejas fueron mezclados, para posteriormente dividirlos en 3 réplicas por cada tratamiento lumínico, hasta cumplir 12 semanas post-eclosión (SPE) (Figura 1).

Una vez eclosionadas, las larvas de *C. estor* fueron alimentadas con rotífero *Brachionus plicatilis* y nauplio de *Artemia sp.*, de acuerdo al esquema de alimentación descrito en Martínez-Palacios *et al.*, (2006). A las 4 SPE, el alimento vivo se complementó con una dieta específica para aterinópsidos (con un 43% de proteína). Es importante mencionar que durante toda la fase experimental, la alimentación fue proporcionada 24 horas al día, con el apoyo de alimentadores automáticos Boyu (ZW-82).

Durante el desarrollo del experimento se adquirieron los datos para evaluar el crecimiento, consumo de alimento y supervivencia. A los 5 días post-eclosión (5 DPE) se realizaron análisis de expresión relativa de genes relacionados con la activación del eje de estrés, la respuesta a estrés oxidativo y la diferenciación sexual. A las 12 semanas post-eclosión (12 SPE), se obtuvieron los organismos experimentales para establecer la determinación sexual, los niveles de hormonas circadianas (Melatonina y Cortisol). Así como los análisis transcriptómicos y metabolómicos desarrollados en el presente trabajo (Figura 1).



**Figura 1.** Estrategia experimental desarrollada para la evaluación del efecto del fotoperiodo en el crecimiento, alimentación y determinación sexual del pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*.



## CAPÍTULO 1. EL FOTOPERIODO Y LOS RITMOS CIRCADIANOS: UNA ADAPTACIÓN EVOLUTIVA AL ESTRÉS OXIDATIVO.

### 1.1. Ritmos biológicos y estrés oxidativo: respuestas ancestrales coevolutivas a variaciones lumínicas

Los organismos que viven en la tierra están sujetos a variaciones geofísicas cíclicas ambientales (disponibilidad de alimento, fotoperiodo, temperatura, salinidad, mareas, oxígeno, dióxido de carbono, etc.) producidas por los movimientos de rotación de la tierra, así como por las interacciones con el sol, la luna y los mismos seres vivos que la habitan (López-Olmeda *et al.*, 2006; Mistlberger, 2009; Storch y Weitz, 2009; Tessmar-Raible *et al.*, 2011; López-Olmeda 2017).

Estas variaciones ambientales constantes y predecibles, han afectado la evolución de los seres vivos dando lugar a los ritmos biológicos, que surgen como respuesta predictiva-adaptativa a estos ciclos y se han descrito desde procariotas hasta vertebrados superiores (DeCoursey, 2004, López-Olmeda *et al.*, 2010; López-Olmeda 2017). Los ritmos biológicos endógenos permiten ajustar la fisiología de un organismo y anticiparse a estos cambios ambientales para alimentarse, refugiarse y reproducirse (Kennis y Mathes, 2013; Foster y Kreitzman, 2014).

El periodo de tiempo en el cual los organismos reciben información lumínica es conocido como fotoperiodo. Estas variaciones de la presencia o ausencia de luz en la tierra no solo han influenciado el comportamiento de los organismos, si no que también son una señal que modula mecanismos biológicos a nivel molecular (Kennis y Mathes, 2013); Al parecer esta relación entre la luz y la vida surgió en desde etapas muy tempranas de la evolución, hace aproximadamente 3,200-3,500 millones de años (Manchester *et al.*, 2015).

Para utilizar la energía lumínica los organismos unicelulares primitivos emplearon mecanismos de fotorrecepción mediante el uso de cromóforos, estas moléculas son capaces de absorber un fotón, que proporciona la energía necesaria para excitar momentáneamente a un electrón a partir de su estado de reposo, lo que promueve un cambio químico (fotoreducción) o conformacional (fotoisomerización) en la molécula (Zhang *et al.*, 2011; Kennis y Mathes, 2013; Fraikin *et al.*, 2015).

La unión de los cromóforos con proteínas dio lugar a las proteínas fotorreceptoras, que traducen la energía fotónica en señales bioquímicas. Cuando el cromóforo recibe un fotón se induce un cambio conformacional en la proteína, lo que activa una cascada de señalización intracelular que incentiva respuestas biológicas, tales como la regulación de la permeabilidad en la membrana celular, la fotosíntesis, la motilidad, el desarrollo de los organismos, respuestas al estrés oxidativo y la regulación de ritmos biológicos (Zhang *et al.*,



2011; Losi y Gartner, 2011; Kennis y Mathes, 2013; Conrad *et al.*, 2014; Fraikin *et al.*, 2015).

Estas particularidades de las proteínas fotorreceptoras les confiere una característica fundamental en el control y preservación de la vida ante las variaciones lumínicas desde tiempos ancestrales. Durante la era primitiva los procariotas conocidos como cianobacterias fueron capaces de absorber los fotones de la luz para activar procesos fotosintéticos, a través del cromóforo contenido en la proteína clorofila, presente en la membrana tilacoidal y que permite obtener la energía necesaria para realizar la fotólisis del agua ( $H_2O$ ) y liberar oxígeno en la fase luminosa. Mientras que en el citoplasma el dióxido de carbono ( $CO_2$ ) es transformado a glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ ) durante la fase nocturna de la fotosíntesis (Duanmu *et al.*, 2017).

La aparición de estos organismos productores de oxígeno derivó en una elevación planetaria de la concentración de esta molécula y de sus derivados oxidantes. A este periodo ocurrido hace ~2500 millones de años, se le conoce como el Gran Evento de Oxidación y se considera que provocó la primer extinción masiva de vida en la tierra (Reiter *et al.*, 2014; Rey y Reddy, 2015).

Algunas de las proteobacterias (alfa-proteobacterias) que sobrevivieron a esta catástrofe, evolucionaron para convertirse en las mitocondrias eucarióticas actuales (Tan *et al.*, 2013; Manchester *et al.*, 2015). Estos orgánulos celulares son la central energética de la célula eucariota actual. En ellos ocurre la re-oxidación de las coenzimas ( $NADH + H^+$  y  $FADH_2$ ), generadas a partir de la oxidación inicial de los nutrientes de los alimentos en el citoplasma celular (glucosa, ácidos grasos, proteínas). La oxidación aunado al proceso de fosforilación oxidativa (OXPHOS) producen Adenosin-Trifosfato (ATP) que es la fuente de energía química que sustenta las actividades biológicas de las células (Tan *et al.*, 2016).

Dicha producción energética depende de la utilización del oxígeno como aceptor final de electrones en el proceso de OXPHOS. Sin embargo el uso de este elemento químico genera especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS), como el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), el anión peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), el ácido peroxinitroso ( $ONOOH$ ) y el nitroperoxicarbonato ( $ONOOCO_2^-$ ) entre otros (Reiter *et al.*, 2014; Manchester *et al.*, 2015).

Además de las ROS y RNS existen las especies reactivas de sulfuro (RSS) (Giles *et al.*, 2017), que incluyen varias formas de cisteína o metionina y componentes de bajo peso molecular como el glutatión, la tripanotona, el micotiol, etc. (Sies *et al.*, 2017). Las especies reactivas de carbonilo (RCS) que incluyen varias formas de aldehídos, lípidos peroxidados, aminoácidos oxidados, así como productos de la ruta sorbitol-aldosa reductasa (3-Deoxiglucosona, 3-Deoxifruktosa), y productos de glicosilación avanzada por



azúcares reductores (AGE) de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, entre otros (Semchyshyn, 2014).

Finalmente las especies reactivas de selenio (RSeS) que incluye residuos de selenocisteína y selenometionina en las proteínas y compuestos de bajo peso molecular, el selenio es particularmente importante en las reacciones de Reducción:Oxidación (redox) de las enzimas antioxidantes tioredoxina reductasa y glutatión peroxidasa (Labunskyy *et al.*, 2014). En conjunto todas las especies reactivas descritas anteriormente pueden desestabilizar los componentes celulares y generar un estrés oxidativo en los organismos (Reiter *et al.*, 2014; Manchester *et al.*, 2015). El estrés oxidativo es un desbalance ocurrido cuando la tasa de producción de especies oxidantes excede la capacidad de defensa antioxidante y los mecanismos de reparación celular, dirigiendo el daño oxidativo de las biomoléculas, la disrupción de las reacciones redox involucrados en la señalización celular (Sies, 1985; Metcalfe y Alvarez, 2010; Sies, 2015).

Esta exposición inicial de la vida primitiva a un ambiente altamente oxidante y de ciclos lumínicos provocó la coevolución de los ritmos biológicos y la generación de sistemas antioxidantes para poder sobrevivir. En la actualidad la distinción entre estas rutas ha sido difícil de definir lo que sugiere que son procesos con un alto grado de interdependencia evolutiva (Rey y Reddy, 2015).

Las defensas antioxidantes son más eficientes en organismos multicelulares que en los unicelulares (Sies *et al.*, 2017). Colonias de *Escherichia coli* pueden defenderse ante la presencia de  $H_2O_2$ , mientras que a nivel individual las bacterias son más propensas al efecto de los oxidantes. Así que se ha propuesto que las condiciones de estrés oxidativo primitivo también fueron una fuerza que motivó la evolución de organismos multicelulares (Shapiro, 1998).

Bajo este escenario se considera que las bacterias primitivas adquirieron la capacidad de producir melatonina. Esta es una molécula hidrofílica y lipofílica (anfipática) con alto potencial antioxidante que directamente puede detoxificar a las células, al donar electrones a las ROS/RNS para estabilizarlas y así evitar la destrucción de los componentes celulares como los ácidos nucleicos, las proteínas, los lípidos, etc. (Reiter *et al.*, 2009).

Una de las teorías más aceptadas es que durante la evolución estas bacterias productoras de melatonina fueron subsecuentemente fagocitadas por hospederos proto-eucariotas, en un proceso conocido como endosimbiosis y eventualmente evolucionaron para convertirse en las mitocondrias y cloroplastos de los eucariotas actuales en un proceso que se inicio hace ~1500 millones de años (Reiter *et al.*, 2014; Manchester *et al.*, 2015; Spang *et al.*, 2015).

Los hospederos eucariotas tienen la capacidad de producir melatonina y estudios más recientes sugieren que los cloroplastos y mitocondrias no han



perdido esta función ancestral ya que presentan la capacidad enzimática para producir altos niveles de melatonina en su interior, principalmente debido a que son una fuente de producción de moléculas oxidantes y requieren de protección constante ante los radicales libres (Tan *et al.*, 2013; Manchester *et al.*, 2015; Tan *et al.*, 2016; He *et al.*, 2016).

Específicamente en la mitocondria la melatonina inhibe procesos apoptóticos no solo mediante la neutralización directa de ROS/RNS, sino que también controla la polaridad de la membrana externa mitocondrial y activa las proteínas de transporte iónico en la membrana interna. Estas acciones mantienen en condiciones óptimas la membrana y las funciones mitocondriales (Tan *et al.*, 2016). Por otro lado, la melatonina activa las enzimas antioxidantes y promueve su transcripción a través de los elementos de respuesta antioxidante en el DNA nuclear. En conjunto estos mecanismos permiten que la célula pueda sobrevivir al estrés oxidativo diario (Manchester *et al.*, 2015; Tan *et al.*, 2016).

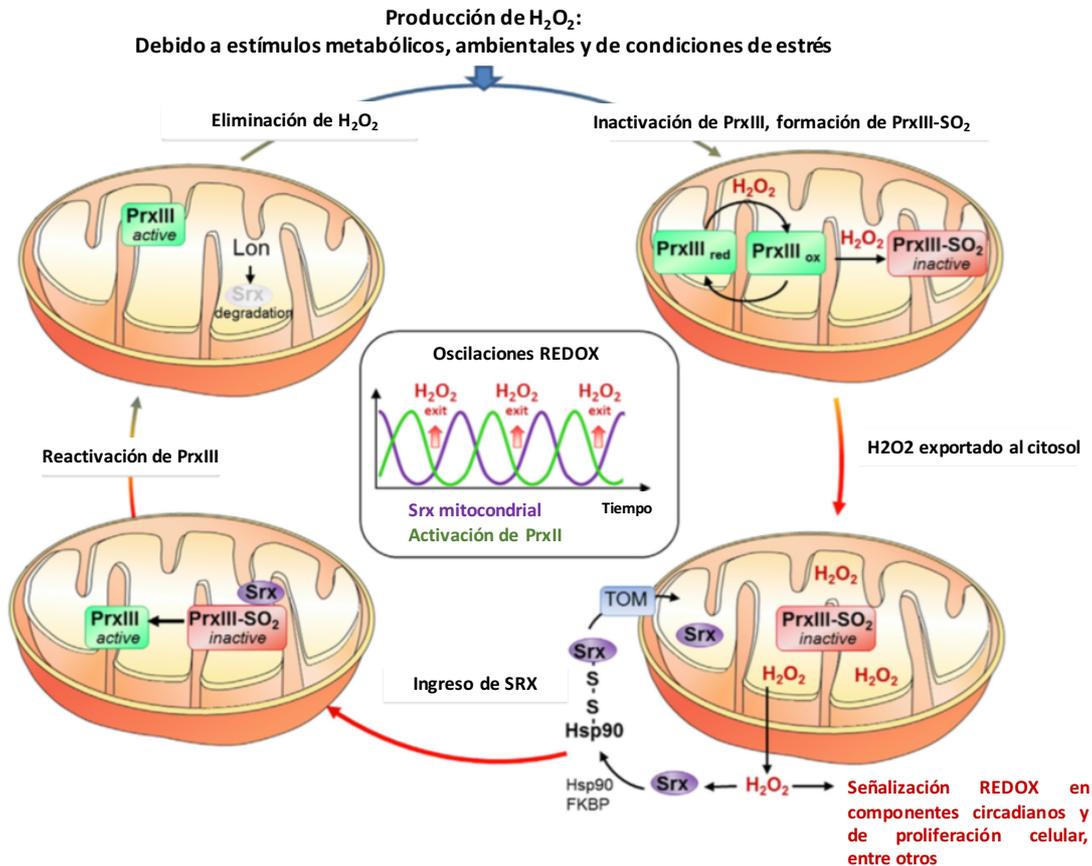
Las observaciones de la vida primitiva sugieren que la melatonina inicialmente aparece como una molécula antioxidante hace unos 3200 millones de años, pero que en el transcurso de la evolución ha adquirido otras funciones como las de regulación circadiana e inducción del sueño. Debido a que en la fase nocturna disminuye la producción de radicales libres por una baja actividad metabólica y aumenta la producción de melatonina, por lo que la acción antioxidante durante esta fase es más potente (Manchester *et al.*, 2015).

Aunado a la melatonina en los organismos unicelulares primitivos surgieron otros mecanismos antioxidantes; tal es el caso de las peroxiredoxinas (PRXs) que son enzimas óxidoreductoras que pueden degradar hasta el 90% del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y que controlan el proteoma de los grupos tiol (O'Neill *et al.*, 2011; O'Neill y Reddy, 2011; Edgar *et al.* 2012; Rey y Reddy, 2015; Toledano y Delaunay-Moisán, 2015). Además las PRXs muestran patrones de variación diaria en las mitocondrias (Kil *et al.*, 2015; Toledano y Delaunay-Moisán, 2015).

Trabajos recientes demuestran que en las mitocondrias modernas existe un oscilador autónomo redox activado por la presencia de  $H_2O_2$ , que es producido por la actividad de OXPHOS. La producción de  $H_2O_2$  está estrechamente relacionada con los estímulos metabólicos por la oxidación de nutrientes (D'Autréaux y Toledano, 2007).

En la mitocondria la actividad del oscilador redox inicia cuando el  $H_2O_2$  oxida a la enzima Peroxiredoxina III (PRXIII) lo que provoca su unión a una molécula de dióxido de azufre (PRXIII-SO<sub>2</sub>). Esta unión inactiva la función reductora de la PRXIII, por lo que existe un incremento de  $H_2O_2$  en la matriz mitocondrial. Paulatinamente las moléculas de  $H_2O_2$  son exportadas al citosol y ocasionan el ingreso de la enzima Sulfiredoxina (SRX) al interior de la mitocondria. (Kil *et al.*, 2015; Toledano y Delaunay-Moisán, 2015). Una vez en el interior

mitocondrial, la SRX elimina la unión del  $\text{SO}_2$  con la PRXIII; esta acción le devuelve a la PRXIII su estado reducido inicial y el ciclo vuelve a comenzar. Bajo este proceso las moléculas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se convierten en moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$ , lo que permite eliminar de una manera cíclica los radicales libres (Kil *et al.*, 2015; Toledano y Delaunay-Moisan, 2015) (Figura 2).



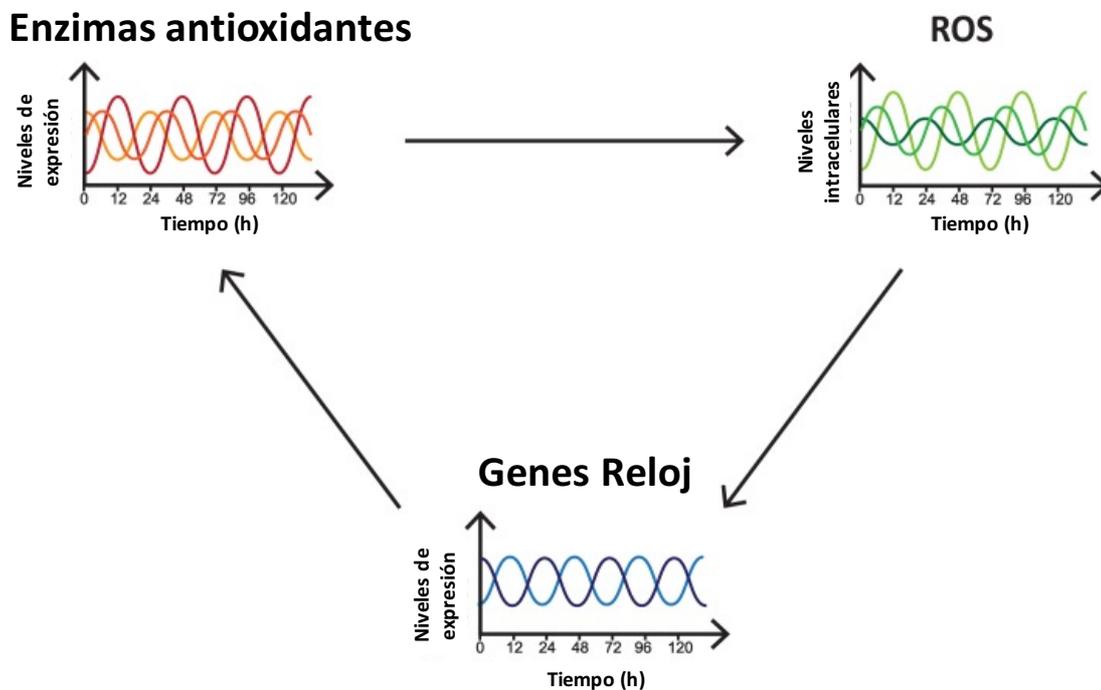
**Figura 2.** Reactivación cíclica de Peroxiredoxina III (PRXIII) en el control de las oscilaciones redox mitocondriales.  $\text{H}_2\text{O}_2$  (peróxido de Hidrógeno),  $\text{SO}_2$  (Dióxido de Azufre), SrX (Sulfiredoxina), Hsp90 (proteína chaperona heat shock protein 90), FKBP (proteína chaperona Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase), TOM (proteína traslocadora de la membrana externa), LON (Serina-proteasa ATP-dependiente). (Modificado de Toledano y Delaunay-Moisan, 2015).

La presencia rítmica y la señales efectoras que produce el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , lo sitúan como un candidato ubicuo que integra las actividades celulares mediante el reclutamiento, la sincronización y el ajuste de las rutas de señalización con respecto al estado metabólico de la célula (D'Autréaux y Toledano, 2007; Bodvard *et al.*, 2017).

Recientemente se ha demostrado que la liberación cíclica del  $\text{H}_2\text{O}_2$  controla las actividades de los factores de regulación redox que son sensibles a los cambios en el estado de reducción en sus grupos tiol (-SH). Entre dichos factores se encuentran algunas proteínas reloj, factores de transcripción, receptores nucleares, cinasas y fosfatasa (Toledano y Delaunay-Moisan,

2015; Hoyle y O'Neill, 2015; Putker y O'Neill, 2016). Esto indica que existen redes funcionales redox en los compartimientos subcelulares que regulan la traducción de proteínas, la glicólisis, el metabolismo lipídico, procesamiento de RNA-mesajeros y micro-RNAs, así como el tráfico de proteínas con residuos de cisteína (Jones y Sies, 2015).

Adicionalmente los niveles de expresión de las enzimas antioxidantes determinan los niveles de ROS intracelular y que afectan los patrones de expresión de los genes reloj. Algunas enzimas antioxidantes siguen patrones de expresión circadiana, lo que sugiere que el sistema reloj puede regular la homeostasis redox a través de la respuesta ante el estrés oxidativo. (Stangherlin y Reddy, 2013) (Figura 3).



**Figura 3.** Vínculo entre los relojes circadianos y la homeostasis redox. Los niveles de expresión y la actividad de enzimas antioxidantes determina los niveles intracelulares de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas afectan directamente los patrones de expresión de los genes reloj. Además algunas enzimas antioxidantes exhiben un patrón circadiano de expresión, lo que sugiere una regulación de los sistemas reloj sobre la homeostasis redox. (Modificado de Stangherlin y Reddy, 2013).

La regulación redox en los grupos tiol ocurre a través de la transferencia de uno o dos electrones (con cambios de  $-SH$  a disulfuro,  $S-S$ ) a los residuos de cisteína/cistina (Cys/CySS) en las proteínas. Evidencia reciente sugiere una coevolución del proteoma de Cys/CySS con los sistemas de detección de  $O_2$  y señalización de  $H_2O_2$  en los organismos multicelulares (Rytönen *et al.*, 2011; Jones y Sies, 2015). De hecho la evidencia indica que el proteoma Cys/CySS se incrementa con la complejidad del organismo (0.5% en procariontes y 2.2%



en mamíferos). Esto sugiere que a través de la evolución ocurrió un incremento en el proteoma de Cys/CySS para poder liderar las funciones biológicas en los organismos multicelulares a través de cambios en las estructuras tiol y disulfuro de las proteínas (Jones, 2010).

Además de la cisteína otro aminoácido que contiene sulfuro, es la metionina, la cual está presente en todas las proteínas y también es oxidada por las ROS, lo que provee una red de modulación redox paralela, en conjunto los proteomas redox de Cys/CySS y Metionina/Metionina-Sulfóxido (Met/MetO) determinan la estructura terciaria de las proteínas, la actividad molecular, las interacciones macromoleculares, el tráfico proteico y coordinan las funciones fisiológicas temporales en los compartimentos subcelulares (Jones y Sies, 2015).

En conjunto todas estas evidencias sugieren que el balance entre el estrés oxidativo con la capacidad antioxidante gobierna los ritmos biológicos y ha dejado una huella visible coevolutiva en estos mecanismos celulares que rigen la vida diaria de los organismos actuales.

## 1.2. Percepción biológica de las variaciones lumínicas circadianas

En los vertebrados la información ambiental es percibida y transportada por las redes de respuesta neuronal a diversos puntos del cerebro que culminan en las principales zonas productoras de hormonas (hipotálamo, hipófisis y glándula pineal). El hipotálamo transmite la información hacia la hipófisis y posteriormente las hormonas producidas llegan a los órganos periféricos (tiroides, gónadas, intestino, riñón, hígado, timo, músculo, etc.) para desencadenar las respuestas fisiológicas (Yaron y Levavi-Sivan, 2011). En contraste, la glándula pineal recibe la información lumínica directamente, produce la hormona melatonina en la fase oscura y la libera directamente en el torrente sanguíneo (Tan *et al.*, 2015).

Los ritmos circadianos son ritmos biológicos diarios que presentan una periodicidad de  $24 \pm 4$  horas (Touitou *et al.*, 2017). Han sido descritos desde procariotas hasta vertebrados superiores y se sabe que han evolucionado para optimizar los eventos metabólicos y el comportamiento de acuerdo con las necesidades fisiológicas y las condiciones ambientales de los organismos (Paschos, 2015, Gachon *et al.*, 2017).

Los ritmos biológicos son gobernados por el sistema circadiano que se organiza en tres componentes principales: a) señales de entrada que actúan como sincronizadores (luz, temperatura, alimento, etc.); b) el oscilador biológico que es una región funcional anatómica que sostiene sus propias oscilaciones y que es capaz de responder a un sincronizador externo para generar un ritmo biológico circadiano; c) las rutas de salida que transmiten esa información y que lideran los cambios fisiológicos (regulación hormonal, homeostasis, etc.) en el organismo (Pando y Sassone-Corsi, 2002; López-Olmeda 2017).



En mamíferos se ha demostrado que los relojes circadianos pueden ser sincronizados por la luz, el alimento, la temperatura, el ejercicio, el estrés y el estrés oxidativo (Ukai y Ueda, 2010; Challet, 2013; Challet, 2015; Van Moorsel *et al.*, 2016; Tahara *et al.*, 2017). Estas evidencias sugieren en conjunto que diversos parámetros ambientales y fisiológicos pueden incidir en la sincronización de los ritmos circadianos en vertebrados, permitiendo la regulación de diversos procesos biológicos como la reparación del DNA, el manejo del estrés oxidativo, las funciones mitocondriales, el metabolismo energético, el comportamiento y la longevidad entre otros (Gavriouchkina *et al.*, 2010; Weger *et al.*, 2011; Kagawa, 2012; Challet, 2013; Conrad *et al.*, 2014; Milev y Reddy, 2015; Van Moorsel *et al.*, 2016).

El alimento modula la fisiología de los organismos a través de la producción-liberación de enzimas, hormonas, metabolitos y motilidad digestiva (Montoya *et al.*, 2010; Del pozo *et al.*, 2012; Yúfera *et al.*, 2014; Hernández-Peréz *et al.*, 2015), estas respuestas biológicas permiten maximizar la utilización del alimento para mantener el balance energético y sus funciones metabólicas (López-Olmeda, 2017).

En vertebrados se han identificado osciladores que responden a la presencia de nutrientes en múltiples órganos (cerebro, hígado, intestino, etc.). Esta respuesta ante el alimento permite una sincronización integral de los ritmos circadianos y las actividades metabólicas en el organismo (Peyric *et al.*, 2013; Tinoco *et al.*, 2014; Nisembaum *et al.*, 2014; Liu y Evans, 2014; Vera *et al.*, 2013; Paschos, 2015; Volkoff, 2016; Conde-Sieira y Soengas, 2017; Gachon *et al.*, 2017, Sanchez-Bretaño *et al.*, 2016).

La luz es considerada como el principal sincronizador de los ritmos circadianos y sin duda ha sido la señal ambiental más estudiada (Zhdanova y Reeb, 2006). Recientemente se han desarrollado trabajos que indican que otras señales no fóticas (temperatura, alimento y mareas) tienen un papel fundamental en la sincronización de los ritmos circadianos de los peces y son igual de importantes que las señales lumínicas (Lazado *et al.*, 2014; López-Olmeda, 2017).

En peces se ha observado que cuando existe una periodicidad en los ritmos de alimentación, los organismos incrementan su actividad de locomoción en anticipación del alimento (Food-anticipatory activity, FAA) (Vera *et al.*, 2007; Nisembaum *et al.*, 2014; Tinoco *et al.*, 2014). Dicha FAA incluso se mantiene por varios días en presencia de condiciones de iluminación u oscuridad constante (Cavallari *et al.*, 2011; Paredes *et al.*, 2015). En condiciones de ausencia de alimento la FAA está presente por un periodo de tiempo, estas características sugieren que existen osciladores endógenos sincronizados por el estímulo alimenticio (López-Olmeda *et al.*, 2010; Cavallari *et al.*, 2011).

La regulación de los ritmos circadianos por la luz ocurre a través del proceso de fototransducción, que es un mecanismo en el cual la información lumínica es



captada por células fotorreceptoras especializadas presentes principalmente en los ojos y en la glándula pineal (Viets *et al.*, 2016; Morshedian y Fain, 2017; Mogi *et al.*, 2017).

Las proteínas fotorreceptoras encargadas de recibir las señales lumínicas son las opsinas. Estas son una clase ancestral de proteínas fotorreceptoras que actúan como receptores de membrana. Están constituidas por 7 hélices transmembranales (7-TM) y presentan el cromóforo isomerizable retinal (derivado de vitamina A) unido covalentemente a un residuo de lisina en la séptima hélice (Zhang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012). De hecho la bacteriorhodopsina 7-TM se ha propuesto como un ancestro de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), los cuales en la actualidad son una superfamilia de receptores de membrana en eucariotas que poseen diversas funciones en la señalización celular ante estímulos externos (Zhang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014<sup>a</sup>).

Las opsinas se dividen en dos diferentes superfamilias: A) las opsinas microbianas, tipo I; y B) las opsinas animales, tipo II (Spudich *et al.*, 2000). Las opsinas microbianas se encuentran en procariontes, algas y hongos. Controlan principalmente el potencial de membrana, la homeostasis iónica, movimientos de flagelos, el desarrollo, almacenamiento energético y síntesis de retinal (Spudich, 2006). Las opsinas tipo II se encuentran en todos los eucariotas superiores, se han identificado más de 1000 tipos diferentes en el reino animal (Yau y Hardie, 2009) y son responsables de la percepción visual, la regulación pigmentaria y el mantenimiento de los ritmos biológicos (Shichida y Yamashita, 2003).

En los vertebrados las opsinas se encuentran localizadas en el segmento externo de las células fotorreceptoras ciliadas denominadas bastones y conos en la retina (Viets *et al.*, 2016; Morshedian y Fain, 2017), así como en los pinealocitos (cone-like) en la glándula pineal (Yau y Hardie, 2009; Nisembaum *et al.*, 2015). Las opsinas, son activadas por la absorción de un fotón, con la consecuente isomerización del cromóforo 11-*cis* retinal a *trans*-retinal, esta acción genera un cambio conformacional de la opsina que activa una cascada de señalización intracelular (Zhang *et al.*, 2011). La opsina amplifica la señal mediante la activación de numerosas moléculas de transducina G $t$  (subunidades G $\alpha$ , G $\beta$ , G $\gamma$ ), la subunidad G $\alpha$  activa a la enzima fosfodiesterasa (PDE), liberándola de dos subunidades gamma (PDE $\gamma$ ), que flanquean a la PDE y que cumplen una función inhibitoria (Lamb *et al.*, 2016).

La PDE libre es capaz de unirse a una molécula de H<sub>2</sub>O e hidrolizar al guanosin-monofosfato cíclico (cGMP), transformándolo en GMP. La reducción de la concentración de cGMP en el citoplasma, deriva en el cierre de canales iónicos de Calcio (Ca<sup>2+</sup>) y Sodio (Na<sup>+</sup>), lo que genera una hiperpolarización de la membrana y desencadena una respuesta eléctrica, que activa las respuestas fisiológicas ante la presencia de luz ambiental (Lamb *et al.*, 2016; Isorna *et al.*, 2017).



Los conos contienen 4 tipos de opsinas responsables de la visión cromática: A) la opsina1 short-wave (*opn1sw*) y opsina2 short-wave (*opn2sw*) sensibles a la luz violeta-azul (ondas del espectro electromagnético comprendidas entre 345-470 nm), B) la opsina1 medium wave (*opn1mw*) sensibles al color verde (450-630 nm), C) la opsina1 long wave (*opn1lw*) sensibles al color rojo 500-700nm y D) la rhodopsina-2 (*rh2*) sensibles al color verde-rojo 480–530 nm. Los bastones presentan rhodopsina-1 (*rh1*) que es sensible al color azul-verde 480-530nm y permite la visión en condiciones de poca luminosidad (Davies *et al.*, 2015; Lamb *et al.*, 2016; Viets *et al.*, 2016; Morshedian y Fain, 2017).

Además de los conos y bastones, la retina presenta un tercer tipo de fotorreceptores conocidos como células retínicas ganglionares intrínsecas fotosensibles (ipRGCs). Estas células contienen Melanopsina (*opn4*) sensible al color azul 460-480 nm, la cual responde a la luz e inicia la despolarización (Graham *et al.*, 2008) y la respuesta sináptica para inhibir la producción de melatonina en la glándula pineal, sincronizar los relojes periféricos y las actividades locomotoras en mamíferos (Provencio y Warthen, 2012; Reiter *et al.*, 2014; Vartanian *et al.*, 2015; Kofuji *et al.*, 2016). Las ipRGCs funcionan como un mediador de la respuesta eléctrica entre los conos-bastones y el cerebro, lo que le confiere una función muy importante en la transducción de señales lumínicas (Provencio y Warthen, 2012).

La glándula pineal de los vertebrados que no son mamíferos posee la capacidad de detectar la luz directamente, ya que posee fotorreceptores llamados pinealocitos (Menaker *et al.*, 1997; Foster y Hankins, 2002; Klein, 2004; Foster y Kreitzman, 2014). Estas células proveen información de la intensidad, espectro y duración de la luz ambiental a través de la secreción de la hormona melatonina (Ekström y Meissl, 1997). La melatonina sincroniza los relojes biológicos y permite mantener un orden fisiológico temporal (Gerkema, 1992; Falcón *et al.*, 2007; Foster y Kreitzman, 2014).

En los peces la melatonina es secretada durante los periodos nocturnos (Falcón *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2015). La inhibición de su síntesis es directamente proporcional a la intensidad, calidad y transmitancia de la luz a través de la ventana pineal de los peces (Migaud *et al.*, 2006; Migaud *et al.*, 2007<sup>a</sup>). La regulación en la síntesis de la melatonina ajusta los patrones diarios y anuales de reproducción, crecimiento, alimentación, migración y descanso entre otros (Falcón *et al.*, 2007; Foster y Kreitzman, 2014; Lima-Cabello *et al.*, 2014).

En investigaciones recientes se han detectado nuevas proteínas fotorreceptoras en la glándula pineal de los teleósteos; la melanopsina (*opn4*), exorhodopsina (*exorh*) y la parapinopsina 1, 2, (*pp1,pp2*). Estas son excitadas por longitudes de onda comprendidas entre 470 a 498 nm, región verde-azul del espectro electromagnético, mientras que el *pp1* es excitado por luz U.V. (Tarttelin *et al.*, 2011; Eilertsen *et al.*, 2014; Koyanagi *et al.*, 2015; Kawano-Yamashita *et al.*, 2015). La presencia de dichas proteínas fotorreceptoras



sugieren que se encuentran involucradas en la modulación de la producción de melatonina, en la glándula pineal de los teleósteos. Sin embargo los mecanismos específicos de acción necesitan ser dilucidados (Koyanagi *et al.*, 2015; Kawano-Yamashita *et al.*, 2015).

Además en teleósteos otros estudios recientes, reportan múltiples opsinas (*va-opsins*, *val-opsins*, *tmt-opsins*, *opn4*, *opn5*) en células fotorreceptoras de la región talámica e hipotalámica, que son sensibles a los espectros verde-azul y ultravioleta (Cavallari *et al.*, 2011; Matos-Cruz *et al.*, 2011; Fischer *et al.*, 2013; Sato *et al.*, 2016; Hang *et al.*, 2016). Finalmente se ha reportado que en el pez cebra existen 42 genes distintos, que codifican para 10 opsinas visuales clásicas y 32 opsinas no visuales incluyendo 10 nuevos genes (Davies *et al.*, 2015).

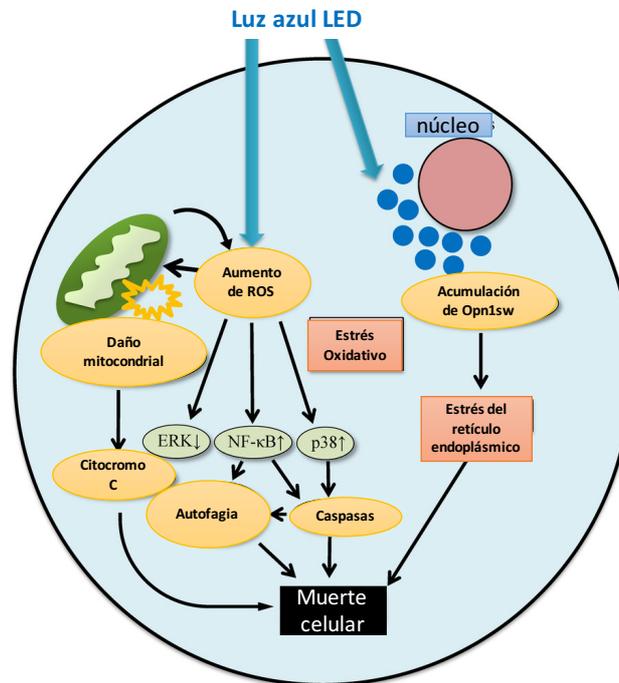
La multiplicidad de opsinas existentes en teleósteos abren nuevos panoramas de exploración para dilucidar la importancia fisiológica de estas células fotorreceptoras en la modulación de los ritmos biológicos en vertebrados y sugiere una red de mecanismos biológicos diversos para responder a la presencia de la luz, que debe ser explorada en futuros estudios sobre teleósteos (Moore y Withmore, 2014; Kawano-Yamashita *et al.*, 2015; Davies *et al.*, 2015; Ramos *et al.*, 2015; Hang *et al.*, 2016).

Otras proteínas involucradas en el proceso de fotorrecepción y modulación de ritmos biológicos son las flavoproteínas. Estas poseen el cromóforo flavina en el cofactor catalítico Dinucleótido Flavina-Adenina (FAD), el cual puede presentar tres diferentes estados de óxido-reducción (redox): 1) la forma oxidada (FADox); 2) la forma semireducida (FADH) donde absorbe un electrón y 3) la forma completamente reducida (FADH<sub>2</sub>) que ha absorbido dos electrones, esta última es la forma que puede ser excitada por un fotón azul para traducir la señal lumínica en bioquímica (Ishikawa-Fujiwara *et al.*, 2017).

Algunos estudios con modelos celulares sugieren que las longitudes de onda 450-490 nm, correspondientes a la luz azul modulan las opsinas (*opn1sw*), melanopsina (*opn4*), el estrés oxidativo, los cambios metabólicos en la mitocondria, el daño en el genoma mitocondrial y la viabilidad celular en células de piel (Nakashima *et al.*, 2017), en fotorreceptores retíales de ratón (Kuse *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2017) y en el epitelio pigmentario retinal de mamíferos (Nakanishi-Ueda *et al.*, 2013; Ishii y Rohrer, 2017; Yacout y Gaillard, 2017) (Figura 4).

Se ha sugerido que la luz azul proveniente de luces LED incrementa el daño mitocondrial por la producción de ROS. Esto produce la activación de la p38MAPK (mitogen-activated protein kinase p38) y el NF-κB (Nuclear factor Kappa Beta), lo que induce la expresión de caspasas, condiciones de autofagia y la consecuente muerte celular. Adicionalmente la acumulación de *opn1sw*, incrementa el estrés del retículo endoplásmico, lo que también dirige la muerte

celular en células fotorreceptoras retíneas de ratón *in vitro* (Kuse *et al.*, 2014) (Figura 4).



**Figura 4.** Posible ruta del daño celular en células fotorreceptoras retíneas 661-W. (Modificado de Kuse *et al.*, 2014).

En células embrionarias Z3 del pez cebra *D. rerio*, la luz azul induce la producción de  $H_2O_2$ , lo que aumenta la expresión de genes reloj PER (period) y CRY (criptocromo) (Hirayama *et al.*, 2007). En fibroblastos ZEM-2S del pez cebra la melanopsina responde a la luz azul y también induce la expresión de los genes PER y CRY mediante la activación de la respuesta a estrés oxidativo (Ramos *et al.*, 2015). En la damisela *Chrysiptera cyanea* se observó que la producción de melatonina ocular decreció con la exposición de la luz azul, pero no de otras longitudes de onda sugiriendo una modulación de la enzima AANAT (arylalkylamine N-acetyltransferase) en células que contienen melanopsina (Takeuchi *et al.*, 2014).

Efectos similares, específicos de la luz azul, han sido observados en la levadura *S. cerevisiae*, a pesar de ser un organismo unicelular. En este organismo se sugiere la participación de un tipo de flavoproteínas, en la regulación de la producción de ROS (Bodvard *et al.*, 2017).

En estas respuestas fisiológicas a la luz azul también se sugiere la intervención de las enzimas flavin-oxidasas que pueden transferir electrones al oxígeno molecular para formar  $H_2O_2$ . El peróxido de hidrógeno a su vez funciona como mensajero redox, que activa a las peroxiredoxinas para liderar las respuestas ante la presencia de luz azul. Estas observaciones fusionan la respuesta



lumínica con el estrés oxidativo y el control de los ritmos circadianos (Hirayama *et al.*, 2007; Losi y Gartner, 2012; Edwards, 2014; Takeuchi *et al.*, 2014; Ramos *et al.*, 2015; Bodvard *et al.*, 2017).

Otras flavoproteínas directamente relacionadas con la percepción lumínica y que son sensibles específicamente a la luz azul y ultravioleta (UV) son la familia de criptocromos/fotoliasas (Conrad *et al.*, 2014). Las fotoliasas están íntimamente relacionadas con la reparación de pirimidinas en el DNA dañado por luz UV en arqueas, bacterias, plantas y animales. Por su parte los criptocromos no presentan funciones de reparación de DNA pero controlan el desarrollo en plantas y de manera importante los ritmos biológicos en animales donde reprimen directamente la expresión de otros genes reloj (Losi y Gartner, 2012; Armstrong, 2013; Crane y Young, 2014; Ishikawa-Fujiwara *et al.*, 2017).

Sin embargo, recientemente se reportó que el criptocromo Cry-DASH también presenta actividad reparadora de DNA y está altamente conservado desde bacterias hasta vertebrados (Daiyasu *et al.*, 2004; Selby y Sancar, 2006; Pokorny *et al.*, 2008; Conrad *et al.*, 2014).

La presencia de múltiples proteínas fotorreceptoras a la luz azul en diferentes modelos biológicos, sugieren que esta longitud de onda del espectro electromagnético es clave en la modulación del estrés oxidativo y en la sincronización de los osciladores circadianos en vertebrados (D'Autréaux y Toledano, 2007; Nakanishi-Ueda *et al.*, 2013; Kuse *et al.*, 2014; Bodvard *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2017; Nakashima *et al.*, 2017; Ishii y Rohrer, 2017).

Especialmente en peces, ya que son organismos que están continuamente expuestos a variaciones fóticas y a la penetración de la luz azul en ambientes acuáticos (Hirayama *et al.*, 2007; Ramos *et al.*, 2015; Hang *et al.*, 2016; Sato *et al.*, 2016; Ishikawa-Fujiwara *et al.*, 2017), debido a que esta longitud de onda es la que presenta más energía para penetrar la columna de agua (Morris, 2017).

### **1.3. Osciladores biológicos: control transcripcional-traducciona l de los ritmos circadianos**

Los osciladores circadianos son mecanismos biológicos que funcionan a través de un sistema de autorregulación, que puede activar o reprimir la presencia de proteínas reloj y han sido descritos desde bacterias hasta vertebrados, lo que sugiere un alto grado de conservación evolutiva que modula la fisiología celular de los organismos (Kaneko *et al.*, 2006; Davies *et al.*, 2015; Takahashi, 2016). En mamíferos se ha demostrado que existen alrededor de 20,000 neuronas en el hipotálamo que actúan como un oscilador central, localizadas en una zona conocida como Núcleo Supraquiasmático (NSC) (Ukai y Ueda, 2010; Arble *et al.*, 2012; Moore, 2013; Mendoza-Viveros *et al.*, 2017). Este recibe la información lumínica sensada por la melanopsina, en las ipRGCs y regula centralizadamente el ritmo biológico de los vertebrados superiores a través del



control de la producción de melatonina en la glándula pineal. Posteriormente la liberación de melatonina en el torrente sanguíneo sincroniza los relojes de los órganos periféricos (Korf *et al.*, 2003; Dibner *et al.*, 2010; Welsh *et al.*, 2010; Brown y Azzi, 2013; Reiter *et al.*, 2014; Challet, 2015).

En los peces no se ha demostrado la presencia de este tipo de oscilador central (Falcón *et al.*, 2010; Zohar *et al.*; 2016; López-Olmeda 2017), pero se ha pensado que la glándula pineal funciona como un NSC. Sin embargo, organismos con extirpación quirúrgica de este órgano o que han sido modificados genéticamente para bloquear sus funciones aún son capaces de mantener las oscilaciones moleculares en órganos periféricos (Yadu y Shedpure, 2002; Ben-Moshe *et al.*, 2016).

Esta información sugiere que existe una red de osciladores periféricos múltiples e independientes, que responden a las diferentes condiciones ambientales (luz, temperatura, alimento, oxígeno, etc.). La interacción de los osciladores es la que lidera en realidad los ritmos circadianos esenciales, reguladores de la fisiología completa del organismo (Kaneko *et al.*, 2006; Dibner *et al.* 2010; Vatine *et al.*, 2011; Lazado *et al.*, 2014; Ben-Moshe *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2016; López-Olmeda 2017).

Los actores moleculares de los osciladores están altamente conservados en vertebrados; se encuentran en todos los tejidos y funcionan a partir de un mecanismo de retroalimentación a nivel transcripcional-traducciona de los componentes circadianos moleculares (Martin-Robles *et al.*, 2012; Foster y Kreitzman, 2014; Takahashi, 2016).

De manera general, durante la fase diurna de regulación positiva, se forman dímeros de proteínas reloj que son factores de transcripción del tipo basic helix-loop-helix (bHLH) y del tipo Period (P), Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like1(A), Single minded domain-containing protein (S) o mejor conocidos como (bHLH/PAS) (Takahashi, 2016).

El primer dímero bHLH/PAS está compuesto por CLOCK/BMAL1 (Circadian locomotor output cycles kaput/ Brain y muscle, aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 1) y el segundo dímero está conformado por NPAS2/BMAL1 (Neuronal Per Arnt Single minded domain-containing protein 2/BMAL1). Ambos presentan funciones complementarias que inician la actividad regulatoria positiva del reloj molecular (DeBruyne *et al.*, 2007; Landgraf *et al.*, 2016).

Los dímeros CLOCK/BMAL y NPAS2/BMAL1 activan la transcripción de RORa,b,c, (retinoic acid-related orphan receptor a,b,c) los cuales se unen a los RORes (ROR response elements [WAWNTRGGTCA]) en la región promotora de los genes BMAL1 y CLOCK, e incentiva de esta manera su transcripción (Zhang y Kay, 2010) (Figura 5). En este proceso la molécula de melatonina juega un papel importante ya que se une al RORa y potencializa la expresión



transcripcional de BMAL1, durante el inicio de la fase diurna (Reiter *et al.*, 2014).

Por otro lado, en la fase de retroalimentación negativa los dímeros (BMAL1:CLOCK/NPAS2) promueven la activación de la expresión de los receptores nucleares NR1D1 y NR1D2 (Nuclear receptor subfamily 1, group D, Member 1 y Member 2). Estos se unen a los RORes y evitan la expresión de BMAL1 durante la fase nocturna (Korencic *et al.*, 2012; Scheiermann *et al.*, 2013). Otros genes que también presentan RORes y son regulados por estos mecanismos de represión son RORc, CRY1,2,3 (Cryptocromo 1,2,3), PER 1,2, (Period 1,2) y NFIL3 (Nuclear Factor Interleukin 3 Regulated), los cuales son componentes que actúan en la modulación oscilatoria circadiana (Korencic *et al.*, 2012; Liu y Evans, 2014) (Figura 5).

Durante esta fase negativa los dímeros (BMAL1:CLOCK/NPAS2) se unen a secuencias E-Box (CACGTG) en la región del promotor e incentivan la expresión de las proteínas que forman el dímero CRY/PER. Este dímero funciona como regulador negativo del ciclo, ya que una vez formado en el citoplasma es transportado al núcleo celular, se une a BMAL1:CLOCK/NPAS2 e inhibe su función en la fase nocturna (Fu y Lee, 2003; Takahashi *et al.*, 2008; Scheiermann *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015; Paschos, 2015) (Figura 5). Además los dímeros BMAL1:CLOCK/NPAS2 promueven la expresión de DEC1, DEC2 (Differentially expressed in chondrocyte 1 y 2) los cuales promueven la activación del promotor de PER con la consecuente inhibición de BMAL1:CLOCK/NPAS2 (Wang *et al.*, 2015; Mendoza-Viveros *et al.*, 2017).

Otros componentes del sistema que igualmente son regulados por BMAL1:CLOCK/NPAS2 en secuencias E-box son NR1D1-NR1D2, ROR, y D-box binding proteins (DBPs) (Korencic *et al.*, 2012), por lo que los dímeros (BMAL1:CLOCK/NPAS2) tienen una función principal en la regulación de la transcripción de los genes encargados de las oscilaciones biológicas (Figura 5), así como de otros genes que contienen secuencias regulatorias E-Box (Takahashi, 2016).

Aunado a estos mecanismos, existe una regulación mediada por las secuencias D-Box (TTATGYAA), en las cuales se unen los factores de transcripción (DBPs): Thyrotroph embryonic factor (TEF), Hepatic leukaemia factor (HIF) y D-box binding protein (DBP) que actúan como coactivadores para los genes reguladores negativos del ciclo CRY, PER, NR1D1 y NR1D2 (Kumaki *et al.*, 2008; Zhang y Kay, 2010; Korencic *et al.*, 2012; Takahashi, 2016).

Como mecanismo de regulación de los DBPs, existe la proteína represora Nuclear Factor Interleukin 3 Regulated Protein (NFIL3) la cuál impide la unión de TEF/HIF/DBP y por tanto sus funciones en los genes diana (Kumaki *et al.*, 2008; Zhang y Kay, 2010; Korencic *et al.*, 2012; Takahashi, 2016), también NFIL3 puede unirse a PER e inhibir su función regulatoria (Tanoue *et al.*, 2015) (Figura 5).



Por otra parte la regulación de las funciones del dímero CRY/PER están sujetas a la actividad de la CK1 $\epsilon$ , Casein Kinase-Epsilon (Takano *et al.*, 2004). Esta cinasa es selectiva para residuos de serina-treonina y actúa para formar el triplete CK1 $\epsilon$ /CRY/PER; donde CK1 $\epsilon$  cumple la función de molécula señal, dirigiendo a CRY/PER al sitio de unión con BMAL1:CLOCK/NPAS2. Posteriormente CK1 $\epsilon$  y GSK3 $\beta$  (Glycogen Synthase Kinase 3 Beta) se encargan de fosforilar a PER para promover su degradación proteosómica (Meng *et al.*, 2008; Maywood *et al.* 2011), (Mendoza-Viveros *et al.*, 2017) (Figura 5).

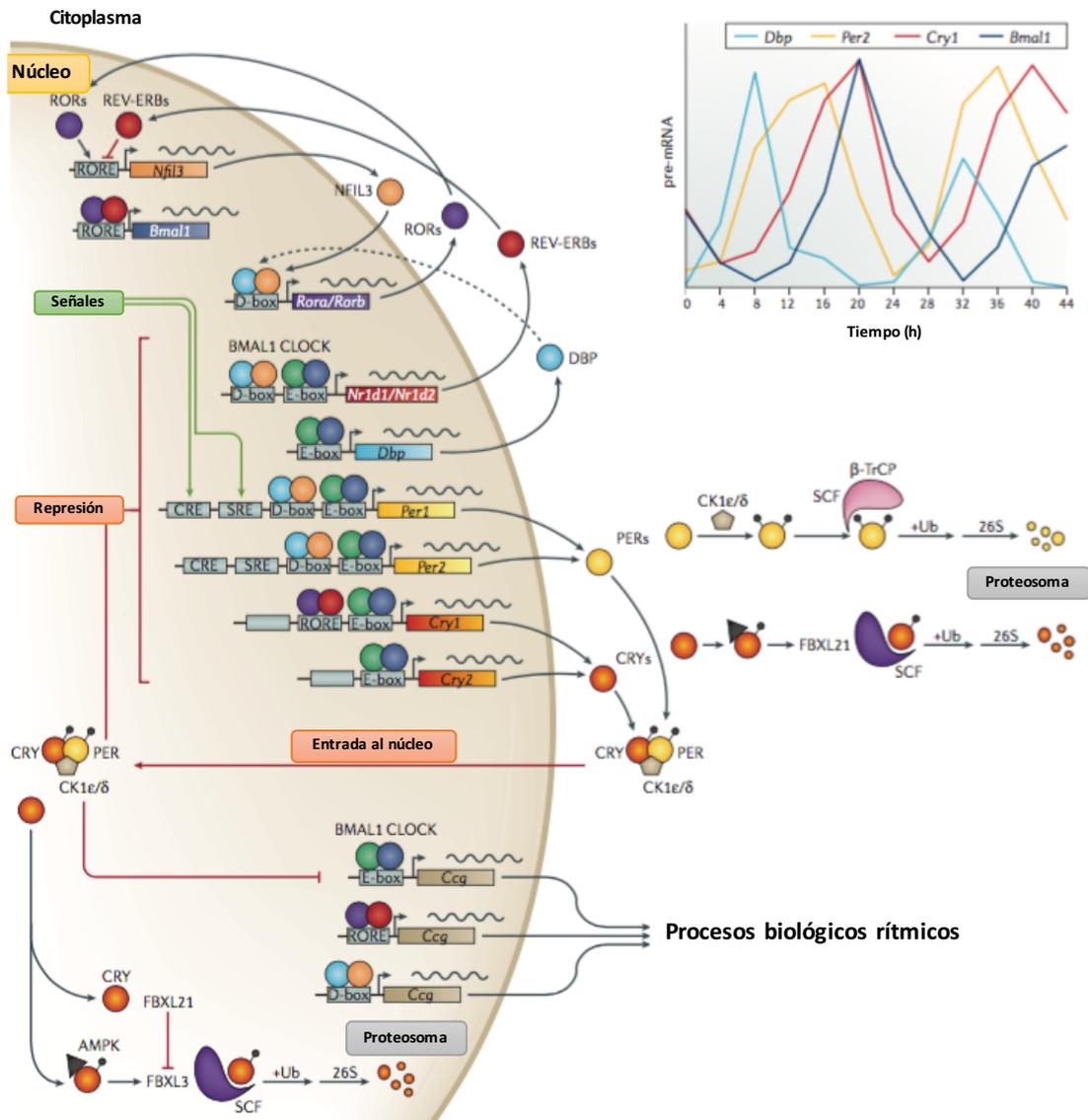
La degradación proteosómica de CRY está mediada por su fosforilación, activada por GSK3 $\beta$  (Mendoza-Viveros *et al.*, 2017) y AMPK (Adenosine monophosphate-activated protein kinase) (Bass y Takahashi, 2010). Un sistema complementario de regulación ocurre cuando FBXL3 (F-box y leucine rich repeat protein 3) se une a en la región FAD de la proteína CRY, lo que regula directamente la duración de la represión transcripcional de CRY/PER sobre BMAL1:CLOCK/NPAS2 (Maywood *et al.* 2011; St. John *et al.*, 2014).

Además se ha propuesto que la melatonina durante la fase nocturna inhibe al sistema proteosómico encargado de degradar las proteínas reloj (CLOCK/BMAL1/CRY/PER), esto confiere una acción directa a la melatonina en la sincronización y funcionalidad de los ritmos circadianos (Vriend y Reiter, 2015).

Estas actividades de formación y degradación del dímero CRY/PER son lentas y progresivas, lo que permite mantener un ciclo de 24 horas donde una vez degradado el dímero CRY/PER el ciclo vuelve a comenzar con la actividad rítmica de BMAL1:CLOCK/NPAS2 sobre los genes diana (Uaki y Ukeda, 2010; Koike *et al.*, 2012; Crane y Young, 2014).

En la red oscilatoria circadiana también participan otros elementos como el adenosin 3'5' monofosfato cíclico (cAMP) y el Ca<sup>2+</sup>, los cuales se encuentran presentes durante la fase luminosa y permiten la transcripción de genes circadianos (O'Neill *et al.*, 2008; O'Neill y Reddy 2012) como AANAT involucrado en la producción de melatonina (Wang *et al.*, 2015).

Adicionalmente se han identificado otros factores de transcripción como Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs), peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC1a) que tienen funciones complementarias en la expresión de genes controlados por el dímero BMAL1:CLOCK/NPAS2, y que se encuentran relacionados con la presencia de estrés oxidativo (Liu *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2012; Paschos, 2015).



**Figura 5.** Red circadiana transcripcional en mamíferos. 5' (AMPK) AMP-activated protein kinase, (CK1) casein kinase 1, (CRE) cAMP response element, (FBX) F-box protein, (SCF) SKP1–cullin–F-box protein, (SER) serum response element, (Ub) ubiquitina. (modificado de Takahashi, 2016).

Finalmente existe prueba suficiente que demuestra que alrededor del 10% del genoma celular está relacionado con los ritmos circadianos (clock control genes, CCGs) (Figura 5), y se indica que existen alrededor de 11,000 genes que están controlados por estos ritmos biológicos en vertebrados y para muchos de los cuales no se conocen aún sus funciones específicas (Zhang *et al.*, 2014<sup>b</sup>; Schick *et al.*, 2016; Mendoza-Viveros *et al.*, 2017; Boyle *et al.*, 2017; Tahara *et al.*, 2017). Debido a lo anteriormente expuesto la maquinaria circadiana es una pieza clave para integrar las señales metabólicas-ambientales, modular la expresión génica y liderar la plasticidad de los organismos para adaptarse y sobrevivir ante condiciones cambiantes (Masri *et al.*, 2015).



#### 1.4. Interacciones entre los osciladores biológicos y el estrés oxidativo

Los estudios en cronobiología revelan que existe una estrecha relación entre los ritmos biológicos y los sistemas redox (Jones y Sies, 2015). Trabajos en el área de los osciladores biológicos indican que la intrincada conexión entre los ritmos circadianos y el metabolismo ha permanecido poco comprendida (Krishnaiah *et al.*, 2017); ya que existen muchos elementos y procesos moleculares que participan directa e indirectamente en la regulación de los osciladores biológicos (Schick *et al.*, 2016).

El estrés oxidativo es uno de los reguladores principales de estos osciladores (Stangherlin y Reddy, 2013; Wilking *et al.*, 2013; Wu y Reddy 2014; Jones y Sies 2015; Milev *et al.* 2015; Wende *et al.*, 2016; Rhee y Kil, 2016; Fanjul-Moles y Lopez-Riquelme 2016; Ray y Reddy, 2016; Rey *et al.*, 2016; Rhee y Kil 2017; Tahara *et al.*, 2017), a través de las variaciones circadianas de los ciclos redox de peroxiredoxinas, glutatión y los residuos de cisteína principalmente (Blanco *et al.*, 2007; Edgar *et al.*, 2012). Las variaciones redox circadianas, regulan diversas funciones fisiológicas como la excitabilidad neuronal, regulación del sistema inmune, metabolismo, crecimiento, entre otros (Wilking *et al.*, 2013).

Además existen controles circadianos epigenéticos que se encuentran conservados desde bacterias hasta vertebrados superiores (Valekunja *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2015; Aguilar-Arnal y Sassone-Corsi, 2015; Masri *et al.*, 2015; Papazyan *et al.*, 2016; Mayo *et al.*, 2017). Adicionalmente en vertebrados se ha demostrado que existe una variación circadiana de RNAs no codificantes (ncRNA), micro RNAs (mirRNA) y RNAs pequeños de interferencia (small interfering RNAs; siRNA), provenientes de regiones intergénicas y que afectan directamente a los osciladores biológicos (Zhang y Kay, 2010; Ben-Moshe *et al.*, 2014; Chen y Yang, 2014; Schick *et al.*, 2016; Micó *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2016; Mendoza-Viveros *et al.*, 2017).

En células epiteliales normales y cancerosas humanas, se observa que una adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> genera condiciones de estrés oxidativo, que aumentan significativamente la expresión y acumulación nuclear de BMAL1 (Matsumoto *et al.*, 2016). En ratones knockout de BMAL1, se ha observado un incremento de las ROS y un consecuente envejecimiento (Kondratov *et al.*, 2006). En fibroblastos embrionarios de ratón las ROS regulan la expresión de PER y están involucradas en la supervivencia o apoptosis celular (Magnone *et al.* 2015). También en macrófagos de ratón se observa un estímulo proinflamatorio y una disrupción de BMAL/PER en presencia de ROS (Wang *et al.*, 2016).

Por otro lado los receptores nucleares conocidos como Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), funcionan como factores de transcripción para múltiples genes. Estos presentan ritmos circadianos de expresión (Cheng y Yang, 2014), se encuentran estrechamente relacionados con la regulación del estrés oxidativo y los osciladores biológicos (Yang *et al.*, 2012; Cheng y Yang, 2014).



Ante la presencia de  $H_2O_2$ , los PPARs activan la expresión de enzimas antioxidantes (Polvani *et al.*, 2012) como catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) que reducen al  $H_2O_2$  en agua (Chung *et al.*, 2009; Okuno *et al.*, 2010). También estimulan la expresión de la superóxido óxido-reductasa (MnSOD) que catalisa la óxido reducción de 2 aniones superóxido  $O_2^-$  en oxígeno molecular y  $H_2O_2$  (Yu *et al.*, 2008; Reuter *et al.*, 2010) y la uncoupling protein2 (UCP2) la cual previene la acumulación de anión superóxido  $O_2^-$  en la mitocondria y controla producción de ROS (Polvani *et al.*, 2012).

Los PPARs controlan también el metabolismo de glucosa y lípidos en interdependencia con los ritmos circadianos (Bellet y Sassone-Corsi, 2010; Cheng y Yang, 2014; Kumar *et al.*, 2015; Mello *et al.*, 2016). Específicamente las isoformas PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$  regulan la expresión de BMAL1 y NR1D1. A su vez BMAL1:CLOCK activa la expresión de PPAR $\alpha$  a través de secuencias E-Box (Bass y Takahashi 2010; Gachon *et al.*, 2017; Chen y Yang, 2014), y PER actúa como inhibidor de la función de PPAR $\gamma$  (Grimaldi *et al.*, 2010).

La PGC1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha) también muestra patrones circadianos de expresión. Esta regula la fosforilación oxidativa y la producción de ROS, a través de la biogénesis mitocondrial y la regulación del dinucleótido de nicotinamida-adenina (NAD $^+$ ) (Bass y Takahashi, 2010). Activa la transcripción de los ROR, los cuales a su vez incentivan la expresión de BMAL1:CLOCK/NPAS2 (Liu *et al.*, 2007; Bellet y Sassone-Corsi, 2010).

Esta comunicación directa de los osciladores circadianos con la homeostasis metabólica, sugiere que la modificación de alguno de estos componentes puede influenciar directamente el estatus energético de las células o sus ritmos circadianos (Cheng y Yang, 2014). Por ejemplo el peróxido de Hidrógeno  $H_2O_2$  en células Z3 y ZEM-2S del pez cebra activan la expresión de los genes reloj PER y CRY (Hirayama *et al.*, 2007; Ramos *et al.*, 2015).

En el ojo de la damisela *Chrysiptera cyanea* la exposición a la luz disminuye la producción del principal componente antioxidante, la melatonina (Takeuchi *et al.*, 2014). También en pez cebra se observa una inhibición de PER sobre de AANAT a través de una secuencia E-Box, lo que minimiza la síntesis de melatonina (Wang *et al.*, 2015). Estos reportes en diversos modelos sugieren una relación estrecha entre los osciladores y la respuesta antioxidante de los organismos a través de la melatonina (Tahara *et al.*, 2017).

Otra fuente importante de producción de la molécula oxidante ( $H_2O_2$ ) ocurre cuando la enzima esteroide 11 $\beta$ -hidroxilasa (CYP11B1) transforma el 11-deoxi-cortisol en cortisol en la membrana interna mitocondrial de la glándula adrenal (Kil *et al.*, 2012). La liberación del  $H_2O_2$  en el citosol celular inhibe la importación del sustrato inicial de síntesis (colesterol), por lo que se establece un sistema de retroalimentación negativa por la acción del peróxido de hidrógeno. Para reestablecer las condiciones iniciales el  $H_2O_2$  es eliminado a



través del sistema PRXIII/SRX (Kil *et al.*, 2012; Toledano y Delaunay-Moisan, 2015).

El cortisol es importante ya que activa la transcripción de genes como PER y CRY, cuando se une al sitio Ebox-GRE (glucocorticoid receptor element) en la región promotora. Además CLOCK se une directamente a los glucocorticoides (GR) y regula su unión al DNA, lo que controla la expresión de PER y CRY (So *et al.*, 2009; Mavroudis *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2014). El cortisol también activa un gran número de genes involucrados en el metabolismo y la producción de metabolitos, esto indica que la regulación de los ritmos circadianos está estrechamente relacionada con la presencia de Glucocorticoides (GRs) a nivel molecular (Ellis *et al.*, 2012; Weger *et al.*, 2016). En peces se ha observado que la presencia de GRs influye en la expresión de diversos genes reloj (CLOCK, BMAL, CRY) y particularmente los genes PER, por lo que se sugiere que el mecanismo de regulación por GRs en vertebrados es altamente conservado (Sanchez- Bretaño *et al.*, 2016).

Las características oxidantes (cortisol) y antioxidantes (melatonina) son especialmente interesantes, ya que se considera que estas hormonas presentan funciones antagónicas en la modulación de los ritmos circadianos y son capaces de modular los patrones diarios de crecimiento, alimentación y reproducción entre otros (Larson *et al.*, 2004; Saito *et al.*, 2004; Ebbesson *et al.*, 2008; Nikaido *et al.*, 2010; López-Patiño *et al.*, 2014; Brüning *et al.*, 2015).

Otros de los actores clave estrechamente involucrados con el estrés oxidativo y los ritmos circadianos son las coenzimas dinucleótido de nicotinamida adenina ( $\text{NAD}^+$ ) (Bellet y Sassone-Corsi, 2010). Así como una molécula derivada de  $\text{NAD}^+$  conocida como dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato ( $\text{NADP}^+$ ) la cual es producida por la acción de la enzima NAD-Kinase, que fosforila a NAD añadiéndole un grupo fosfato (Oka *et al.*, 2012).

Tanto  $\text{NAD}^+$  como  $\text{NADP}^+$  se encuentran en su estado oxidado y tienen la capacidad de incorporar dos electrones en el anillo de la nicotinamida. Esta acción reduce las moléculas y produce  $\text{NADH}+\text{H}^+$  y  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  respectivamente, por lo que estas coenzimas son capaces de transferir electrones en reacciones redox (Bellet y Sassone-Corsi, 2010; Oka *et al.*, 2012) (Figura 6). Además las coenzimas  $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADP}^+$  esta involucradas en la activación del sistema inmune, desacetilación de proteínas, procesos de reparación del DNA, resistencia ante ROS y apoptosis (Oka *et al.*, 2012; Massudi *et al.*, 2012).

Los sistemas  $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$  en conjunto con el sistema tiol/disulfuro, son centrales en el código redox (Jones y Sies, 2015). El sistema NAD utiliza deshidrogenasas que son activadas en procesos catabólicos de biomoléculas que presentan enlaces covalentes de carbono, oxígeno, azufre, nitrógeno e hidrógeno. La proporción de  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  se encuentra en equilibrio con los



sustratos reducidos/oxidados de las deshidrogenasas y es central en la producción energética (Brigelius-Flohé y Flohé, 2011).

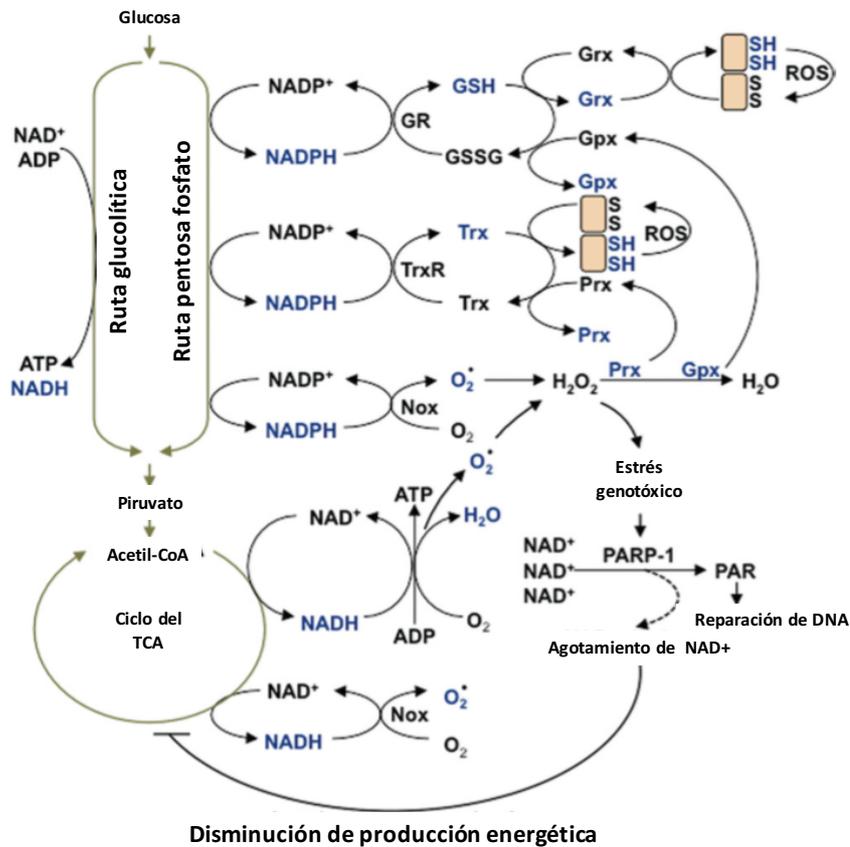
Durante los procesos metabólicos, como en el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y en la ruta glicolítica, las moléculas de  $\text{NAD}^+$  son reducidas a  $\text{NADH}+\text{H}^+$ . Una vez reducidas son las encargadas de transportar los electrones hacia la cadena transportadora en la membrana interna mitocondrial para la producción de ATP. Este proceso consume oxígeno e incrementa la producción de ROS (Bellet y Sassone-Corsi, 2010) (Figura 6).

El  $\text{NAD}^+$  puede ser también utilizado como cofactor por la enzima poli [ADP-ribosa] polimerasa 1 (PARP-1), la cual repara el DNA, disminuye la disponibilidad de  $\text{NAD}^+$  con la consecuente atenuación de los procesos metabólicos y la producción de ROS (Oka *et al.*, 2012). PARP-1 también está involucrada en la regulación de la transcripción, apoptosis y regulación del ciclo celular, por lo que la participación de  $\text{NAD}^+$  presenta una función clave en la modulación circadiana de las actividades celulares (Kolthur-Seetharam *et al.*, 2006; Bellet y Sassone-Corsi, 2010) (Figura 6).

Por otro lado en la ruta de la pentosa-fosfato (ruta metabólica estrechamente relacionada con la glucólisis), las moléculas de  $\text{NADP}^+$  son reducidas a  $\text{NADPH}+\text{H}^+$ . Posteriormente, dichos electrones son transferidos a los sistemas de Glutación (GSH) y Thioredoxina/Peroxiredoxina (TRX/PRX), los cuales reducen a las ROS y a las proteínas que se encuentran oxidadas en sus grupos tiol (-SH) (Oka *et al.*, 2012; Toledano y Delaunay-Moisan, 2015; Hoyle y O'Neill, 2015; Putker y O'Neill, 2016). Estos hallazgos indican que el sistema  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}+\text{H}^+$  es central en el metabolismo, defensa y control de los sistemas tiol/disulfuro, los cuales controlan el estado redox de la célula (Jones y Sies, 2015).

Las molécula reducidas  $\text{NADH}$  y  $\text{NADPH}$  son utilizadas por las  $\text{NADPH}$  oxidasas (NOXs), las cuales toman el  $\text{O}_2$  y lo convierten en anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) que a su vez formará  $\text{H}_2\text{O}_2$ , por la acción de la superóxido dismutasa 3, lo que estimula la presencia de ROS en el espacio extracelular (Reiter *et al.*, 2014; Manchester *et al.*, 2015; Sies *et al.*, 2017), este comportamiento de las moléculas  $\text{NADH}/\text{NADPH}$  les confiere un papel central en la regulación del estrés oxidativo celular (Oka *et al.*, 2012).

Los sistemas  $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$  también regulan de manera importante la sensibilidad redox de los residuos de cisteína y metionina en las proteínas; en donde el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es el principal oxidante y los sistemas TRX/GSH son los principales reductores de grupos disulfuro en los residuos de Cisteína/cistina. Estos sistemas reductores dependen de la unión a  $\text{NADPH}$ -reductasas, lo que crea un sistema redox proteínico inherentemente balanceado por la actividad celular a través de la disponibilidad de  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  (Jones y Sies, 2015) (Figura 6).



**Figura 6.** Principales funciones de los nucleótidos (NAD, NADP) como transportadores de electrones y señalizadores biológicos. El  $\text{NADP}^+$ , es reducido por la ruta pentosa fosfato. El NADPH es utilizado para eliminar las ROS, así como para reducir proteínas oxidadas a través de los sistemas TRX (Tioredoxina) y GSH (Glutathión) con la participación de GRX (Glutaredoxina), GPX (Glutatión peroxidasa) y PRX (Peroxiredoxina). El  $\text{NAD}^+$  es reducido por la ruta catabólica glicolítica y del ciclo del ácido tricarbóxico (TCA). Los electrones del NADH son transferidos a la cadena transportadora de electrones, para convertir ADP en ATP. El estrés genotóxico (daño al DNA por radicales libres) es reconocido por PARP-1 (poli [ADP-ribosa] polimerasa 1), la cual facilita la ribosilación del ADP, un paso importante en la reparación del DNA. (Modificado de Oka *et al.*, 2012).

La coordinación del control metabólico por el sistema  $\text{NAD}^+$  y el control de la organización espacio-temporal del proteoma redox por el sistema  $\text{NADP}^+/\text{H}_2\text{O}_2$ , permite el control de las actividades centrales celulares que incluyen la mitosis, meiosis, diferenciación, senescencia, apoptosis y procesos multicelulares complejos como la fertilización, el desarrollo, la cicatrización y la reparación de daños en ácidos nucleicos, entre otros (Sakamaki *et al.*, 2006; Jones y Sies, 2015).

Como se ha mencionado la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  proviene principalmente de la respiración celular y la actividad de la NADPH oxidasas, por lo que los niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  están directamente relacionados con los niveles de actividad celular (Quinlan *et al.*, 2014). Por lo que la intrincada relación del metabolismo de  $\text{NAD}^+$  y los ritmos circadianos (Sassone-Corsi, 2012), permite que los sistemas redox



celulares dirijan la adaptación de los organismos a los cambios ambientales, incluyendo la disponibilidad de nutrientes, la exposición y vulnerabilidad ante agentes peligrosos y/o predadores. Esta estructura redox es la encargada de mantener el sistema inmune y el crecimiento bajo las condiciones de un ambiente cambiante a través del control de la homeostasis, el metabolismo energético y la estructura proteómica (Jones y Sies, 2015).

Una enzima que puede transferir electrones de  $\text{NADH}+\text{H}^+$  a  $\text{NADP}^+$  es la nicotinamida nucleótido transhidrogenasa (NNT), esta reacción es reversible por lo que en condiciones de alta demanda metabólica el  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  es consumido para soportar la producción de  $\text{NADH}+\text{H}^+$  y la producción de ATP, lo cual debilita la acción antioxidante de  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  (Sies *et al.*, 2017).

La producción de  $\text{NAD}^+$  está mediada por la acción de la enzima nicotinamida fosforibosil transferasa (NAMPT), la cual convierte la nicotinamida en mononucleótido de nicotinamida (NMN). Posteriormente la NMN es utilizada para sintetizar  $\text{NAD}^+$ , por medio de la enzima NMN adeninil transferasa (NMNAT) (Oka *et al.*, 2012; Eckel-Mahan y Sassone-Corsi, 2013) (Figura 7).

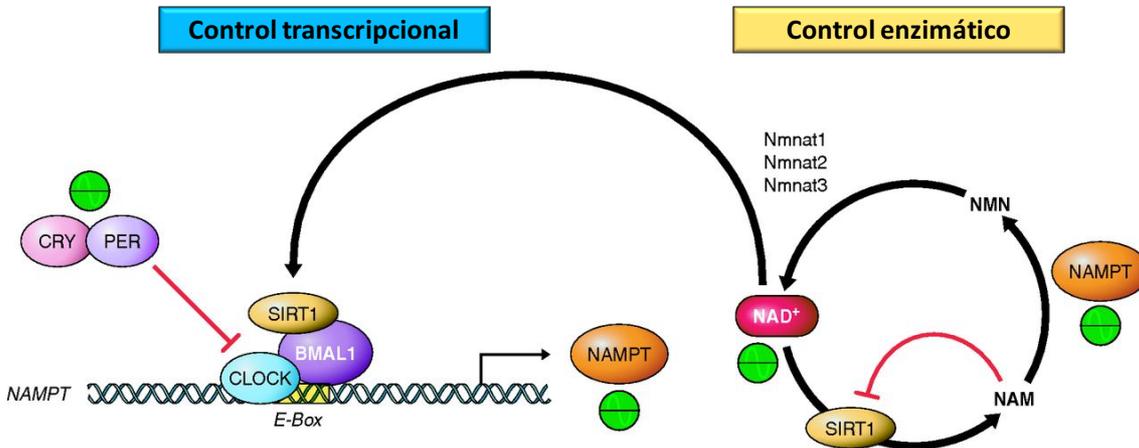
La producción circadiana de  $\text{NAD}^+$  es controlada directamente por el dímero BMAL1:CLOCK/NPAS2, que se une a la región E-Box del promotor de NAMPT y que regula su síntesis a nivel transcripcional (Bellet y Sassone-Corsi, 2010). De hecho no solo la biosíntesis de  $\text{NAD}^+$ , sino la de los nucleótidos y los aminoácidos también está controlada por los ritmos circadianos (Krishnaiah *et al.*, 2017).

La unión del dímero BMAL1:CLOCK/NPAS2 con el DNA es afectada directamente por  $\text{NAD}^+$ . La actividad positiva de transcripción solo se observa cuando existe una alta concentración de NADH (Bellet y Sassone-Corsi, 2010). Esto sugiere que la regulación por  $\text{NAD}^+$  se debe en parte a su acción como cofactor de enzimas que modifican la estructura de la cromatina, por lo que el estado redox de la célula regula directamente las funciones de los osciladores circadianos a través de controles epigenéticos (Nakahata y Bessho, 2016) (Figura 7).

De hecho CLOCK no solo es un factor de transcripción, si no que presenta también una actividad de histona acetil-transferasa (HAT). Por lo que es capaz de acetilar residuos de lisina en las histonas mediante la transferencia de un grupo acetilo ( $-\text{COCH}_3$ ) para formar N-acetil-lisina. Este proceso neutraliza la carga positiva de las histonas y reduce su afinidad con el DNA, permite la expansión de la cromatina y en consecuencia activa la transcripción de genes (Doi *et al.*, 2006; Masri *et al.*, 2013).

Por otro lado, la Sirtuina 1 (SIRT1) y la Sirtuina (SIRT6) son enzimas histona deacetilasas (HDACs), que remueven grupos acetilo del residuo de lisina. Estas son activadas por la presencia de  $\text{NAD}^+$  de una forma circadiana (Bellet y Sassone-Corsi, 2010; Eckel-Mahan y Sassone-Corsi, 2013; Xi y Chen, 2014)

(Figura 7). En el proceso de desacetilación SIRT1 hidroliza a  $\text{NAD}^+$ , lo que produce Nicotinamida y ADP-ribosa, esta última es capaz de incorporar el grupo acetilo a su estructura para formar 2-O-Acetil-ADP-ribosa y así lograr la desacetilación de las histonas (Oka *et al.*, 2012).



**Figura 7.** Las sirtuinas vinculan los ritmos circadianos y el metabolismo. La unión del complejo SIRT1:CLOCK:BMAL activa la expresión de NAMPT (Nicotinamida Fosforibosil Transferasa), principal enzima que controla la producción de  $\text{NAD}^+$ . (Modificado de Eckel-Mahan y Sassone-Corsi, 2013).

De hecho SIRT1 se une al complejo BMAL1:CLOCK/NPAS2 para activar la transcripción de NAMPT, por lo que SIRT1 regula la presencia oscilatoria de su propia coenzima  $\text{NAD}^+$  y es clave en la regulación de los ritmos circadianos y cofactores del metabolismo (Bellet y Sassone-Corsi, 2010; Eckel-Mahan y Sassone-Corsi, 2013; Xi y Chen, 2014) (Figura 7).

Otros componentes de remodelación de la cromatina que están relacionados con la expresión de SIRT1 son las enzimas asociadas a las histonas externas (HIST1H1B). Su presencia es requerida para la unión de SIRT1, el enriquecimiento de la dimetilación de la histona 3 en la lisina 9 (H3K9me2), la compactación de la cromatina y la expresión de genes relacionados al crecimiento (Li *et al.*, 2012).

Por último la presencia de la Sirtuina 6 activa un estado represivo de la cromatina, reduce la unión de BMAL1:CLOCK/NPAS2 y controla la expresión de genes relacionados directamente con el metabolismo de carbohidratos y ácidos grasos como el factor de transcripción SREBP-1. Todas las evidencias en conjunto indican una estrecha relación entre el metabolismo, el estrés oxidativo y los ritmos circadianos a través de controles epigenéticos (Masri *et al.*, 2014; Xi y Chen, 2014).

En conjunto todas estas evidencias sugieren que no se cuenta actualmente con una comprensión total del funcionamiento de los ritmos circadianos, ya que son mecanismos con un alto grado de complejidad que requiere de estudios profundos para poder dilucidar el funcionamiento de los osciladores biológicos



y la participación del estrés oxidativo en este proceso, por lo que es necesario realizar un mayor número de investigaciones en este campo para tener una mejor comprensión del fenómeno biológico.

## 1.5. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-Arnal L, Sassone-Corsi P (2015) Chromatin landscape and circadian dynamics: Spatial and temporal organization of clock transcription. *PNAS*,112(22):6863-6870. doi:10.1073/pnas.1411264111
- Arble DM, Copinschi G, Vitaterna MH, Van Cauter E, Turek FW (2012) Circadian rhythms in neuroendocrine systems. In *Handbook of Neuroendocrinology* (pp. 271-305). Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-375097-6.10012-5
- Armstrong FA. Photons in biology (2013) *Interface Focus*, 3(5):20130039. doi:10.1098/rsfs.2013.0039
- Ayala MD, Abellán E, Arizcun M et al. (2013) Muscle development and body growth in larvae and early post-larvae of shi drum, *Umbrina cirrosa* L., reared under different larval photoperiod: muscle structural and ultrastructural study, *Fish Physiol Biochem* 39: 807. doi:10.1007/s10695-012-9742-x
- Bapary MAJ, Amin MN, Takeuchi Y, Takemura A (2011) The stimulatory effects of long wavelengths of light on the ovarian development in the tropical damselfish, *Chrysiptera cyanea* Aqua 314 188–192. doi. 10.1016/j.aquaculture.2011.02.006
- Bass J and Takahashi JS (2010) Circadian Integration of Metabolism and Energetics. *Science*, 330(6009):1349-1354. doi.10.1126/science.1195027
- Begtashi I, Rodriguez L, Moles G, Zanuy S, Carrillo M (2004) Long-term exposure to continuous light inhibits precocity in juvenile male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). I. Morphological aspects. *Aqua* 241,1–4(26) 539-559. doi.10.1016/j.aquaculture.2004.07.011
- Bellet MM and Sassone-Corsi P (2010) Mammalian circadian clock and metabolism the epigenetic link, *J Cell Sci*, 123: 3837-3848. doi. 10.1242/jcs.051649
- Ben-Moshe Z, Alon S, Mracek P, et al. (2014) The light-induced transcriptome of the zebrafish pineal gland reveals complex regulation of the circadian clockwork by light. *Nucl Acid Res* 42(6):3750-3767. doi.10.1093/nar/gkt1359
- Ben-Moshe LZ, Alon S, Vallone D, Bayleyen Y, Tovin A, Shainer I, et al. (2016) Genetically Blocking the Zebrafish Pineal Clock Affects Circadian Behavior. *PLoS Genet* 12(11): e1006445. doi:10.1371/journal.pgen.1006445
- Blancas-Arroyo G, Figueroa-Lucero G, Barriga-Sosa IA, Arredondo-Figueroa JL (2004) Effects of an artificial photothermal cycle on the reproduction of the shortfin silverside, *Chirostoma humboldtianum*, Valenciennes,1935 (Pisces:Atherinopsidae). *Aqua*, 241: 575-585. doi. 10.1016/j.aquaculture.2004.08.014
- Blanco RA, Ziegler TR, Carlson BA, Cheng PY, Park Y, Cotsonis GA, Accardi CJ, Jones DP (2007) Diurnal variation in glutathione and cysteine redox states in human plasma. *Am J Clin Nutr* 86: 1016–1023.
- Blanco-Vives B, Aliaga-Guerrero M, Cañavate JP, Muñoz-Cueto JA, Sánchez-Vázquez FJ (2011) Does Lighting Manipulation During Incubation Affect Hatching Rhythms and Early Development of Sole? *Chron Int* 28,4, 300-306. doi.10.3109/07420528.2011.560316
- Bodvard K, Peeters K, Roger F, Romanov N, Igbaria A, Welkenhuysen N, Palais G, Reiter W, Toledano MB, Käll M, Molin M (2017) Light-sensing via hydrogen peroxide and a peroxiredoxin *Nature Communications* 8,14791. doi. 10.1038/ncomms14791
- Bonasio R (2015) The expanding epigenetic landscape of non-model organisms. Hoppeler HH, ed. *The Journal of Experimental Biology*. 218(1):114-122. doi.10.1242/jeb.110809
- Boyle G, Richter K, Priest HD, Traver D, Mockler TC, Chang JT, et al. (2017) Comparative Analysis of Vertebrate Diurnal/Circadian Transcriptomes. *PLoS ONE* 12(1): e0169923. doi.10.1371/journal.pone.0169923
- Brigelius-Flohé R and Flohé L (2011) Basic Principles and Emerging Concepts in the Redox Control of Transcription Factors. *Antiox & Redox Sign.* 15(8):2335-2381. doi:10.1089/ars.2010.3534
- Bromage N, Porter M, Randall C (2001). The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. *Aqua* 197, 63–98. doi.10.1016/S0044-8486(01)00583-X
- Brown SA, Azzi A (2013) Peripheral circadian oscillators in mammals. *Handb Exp Pharmacol.*(217):45-66. doi. 10.1007/978-3-642-25950-0\_3



- Brown EE, Baumann H, Conover DO (2014) Temperature and photoperiod effects on sex determination in a fish. *J Exp Mar Biol Ecol* 461, 39-43. doi.10.1016/j.jembe.2014.07.009
- Brüning A, Hölker F, Franke S, Preuer T, Kloas W (2015) Spotlight on fish: Light pollution affects circadian rhythms of European perch but does not cause stress, *Sci Total Env*, 511, 516-522. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.094.
- Cavallari N, Frigato E, Vallone D, Fröhlich N, López-Olmeda JF, Foa A, Berti R, Sánchez-Vázquez FJ, Bertolucci C, Foulkes NS (2011) A blind circadian clock in cavefish reveals that opsins mediate peripheral clock photoreception. *PLoS Biol.* 9, e1001142. doi. 10.1371/journal.pbio.1001142
- Challet E (2013) Circadian clocks, food intake, and metabolism. *Prog Mol Biol Transl Sci* 119: 105–135. doi./10.1016/B978-0-12-396971-2.00005-1
- Challet E (2015) Keeping circadian time with hormones. *Diabetes Obes Metab*, 17: 76–83. doi.10.1111/dom.12516
- Chen L and Yang G (2014) PPARs Integrate the Mammalian Clock and Energy Metabolism, *PPAR Research*, 653017; 6. doi.10.1155/2014/653017
- Chen WJ, Wu C, Xu Z, Kuse Y, Hara H, Duh EJ (2017) Nrf2 protects photoreceptor cells from photo-oxidative stress induced by blue light, *Exp Eye Res*, 154;151-158.doi.org/10.1016/j.exer.2016.12.001.
- Chrétien E and Chapman LJ (2016) Tropical fish in a warming world: thermal tolerance of Nile perch *Lates niloticus* (L.) in Lake Nabugabo, Uganda. *Conserv Physiol* 4(1): cow062. doi.10.1093/conphys/cow062
- Choi CY, Shin HS, Choi YJ, Kim NN, Lee J, Kil GS (2012) Effect of LED light spectra on starvation-induced oxidative stress in the cinnamon clownfish *Amphiprion melanopus*. *Comp Biochem and Physio Part A: Mol & Int Physio*, 163, 3–4,357-363. doi.10.1016/j.cbpa.2012.07.005
- Choi CY, Shin HS, Kim NN, Yang S-G, Kim B-S, Yu YM (2015) Time-related effects of various LED light spectra on reproductive hormones in the brain of the goldfish *Carassius auratus*. *Biol. Rhythm. Res.* 46, 671–682. doi.10.1080/09291016.2015.1046247
- Choi JY, Kim TH, Choi YJ, Kim NN, Oh S-Y, Choi CY (2016) Effects of various LED light spectra on antioxidant and immune response in juvenile rock bream, *Oplegnathus fasciatus* exposed to bisphenol A. *Environ Tox Pharma* 382-6689(16)30134. doi.10.1016/j.etap.2016.05.026
- Chung SS, Kim M, Youn B et al (2009) Glutathione peroxidase 3 mediates the antioxidant effect of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  in human skeletal muscle cells. *Mol Cell Biol.* 29,1; 20–30. doi. 10.1128/MCB.00544-08
- Comte L and Olden JD (2017), Evolutionary and environmental determinants of freshwater fish thermal tolerance and plasticity. *Glob Change Biol*, 23: 728–736. doi.10.1111/gcb.13427
- Conde-Sieira M and Soengas JL (2017) Nutrient Sensing Systems in Fish: Impact on Food Intake Regulation and Energy Homeostasis. *Front. Neurosci.* 10:603. doi. 10.3389/fnins.2016.00603
- Conrad KS, Manahan CC, Crane BR (2014) Photochemistry of Flavoprotein Light Sensors. *Nature chem biol*,10(10):801-809. doi.10.1038/nchembio.1633
- Corona-Herrera GA, Tello-Ballinas JA, Hattori RS, Martínez-Palacios CA, Strüssmann CA, Cárdenas-Reygadas R & Martínez-Chávez CC (2016) Gonadal differentiation and temperature effects on sex determination in the freshwater pike silverside *Chirostoma estor* Jordan 1880. *Environ Biol Fish* 99:463-471. doi.10.1007/s10641-016-0491-z
- Crane BR and Young MW (2014) Interactive features of proteins composing eukaryotic circadian clocks. *Ann. Rev. Biochem.* 83, 191–219. doi.10.1146/annurev-biochem-060713-035644
- D'Autreaux B, Toledano (2007) ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 813–824.doi:10.1038/nrm2256
- Daiyasu H, Ishikawa T, Kuma K, Iwai S, Todo T, Toh H (2004) Identification of cryptochrome DASH from vertebrates. *Genes to Cells*, 9: 479–495. doi.10.1111/j.1356-9597.2004.00738.x
- Davies WIL, Tamai TK, Zheng L, et al. (2015) An extended family of novel vertebrate photopigments is widely expressed and displays a diversity of function. *Genome Research*, 25(11):1666-1679. doi:10.1101/gr.189886.115
- DeBruyne JP, Weaver DR, Reppert SM (2007) CLOCK and NPAS2 have overlapping roles in the suprachiasmatic circadian clock. *Nat Neurosci* 10: 543–545. doi.10.1038/nn1884
- DeCoursey, P.J., 2004. The Behavioral Ecology and Evolution of Biological Timing Systems. In: Dunlap, J.C., Loros, J.J., DeCoursey, P.J. (Eds.), *Chronobiology. Biological Timekeeping*. Sinauer Associates, Sunderland, USA, pp. 27–65



- Del Pozo A, Montoya A, Vera LM, Sánchez-Vázquez FJ (2012) Daily rhythms of clock gene expression, glycaemia and digestive physiology in diurnal/nocturnal European seabass. *Physiol. Behav.* 106, 446–450. doi:10.1016/j.physbeh.2012.03.006
- Di Rosa V, Frigato E, López-Olmeda JF, Sánchez-Vázquez FJ, Bertolucci C (2015) The Light Wavelength Affects the Ontogeny of Clock Gene Expression and Activity Rhythms in Zebrafish Larvae. *PLoS ONE* 10(7): e0132235. doi:10.1371/journal.pone.0132235
- Dibner C, Schibler U, Albrecht U (2010) The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu. Rev. Physiol.* 72,517–549. doi:10.1146/annurev-physiol-021909-135821
- Doi M, Hirayama J, Sassone-Corsi P (2006) Circadian Regulator CLOCK Is a Histone Acetyltransferase. *Cell*,125 (3) 497-508. doi:10.1016/j.cell.2006.03.033
- Duanmu D, Rockwell NC, Clark Lagarias J (2017) Algal light sensing and photoacclimation in aquatic environments. *Plant, Cell & Env* doi. 10.1111/pce.12943
- Ebbesson LOE, Björnsson BT, Ekström P, Stefansson SO (2008) Daily endocrine profiles in parr and smolt Atlantic salmon. *Comp. Biochem. Physiol. A* 151, 698–704. doi:10.1016/j.cbpa.2008.08.017
- Eckel-Mahan K and Sassone-Corsi P. (2013) Metabolism and the Circadian Clock Converge. *Physio Rev.* 2013;93(1):107-135. doi:10.1152/physrev.00016.2012
- Edgar RS, Green EW, Zhao Y, et al. (2012) Peroxiredoxins are conserved markers of circadian rhythms. *Nature.* 485(7399):459-464. doi:10.1038/nature11088
- Edwards AM (2014) Structure and general properties of flavins. *Methods Mol. Biol.* 1146, 3–13. doi:10.1007/978-1-4939-0452-5\_1
- Eilertsen M, Drivenes Ø, Edvardsen RB, Bradley CA, Ebbesson LOE, Helvik JV (2014) Exorhodopsin and melanopsin systems in the pineal complex and brain at early developmental stages of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *J. Comp. Neurol.*, 522: 4003–4022. doi:10.1002/cne.23652
- Ellis T, Yildiz HY, López-Olmeda J, Spedicato MT, Tort L, Øverli Ø, Martins C (2012) Cortisol and finfish welfare. *Fish Physiol. Biochem.* 38, 163–188. doi:10.1007/s10695-011-9568-y
- Endal HP, Taranger GL, Stefansson SO, Hansen T (2000) Effects of continuous additional light on growth and sexual maturity in Atlantic salmon, *Salmo salar*, reared in sea cages. *Aqua* 191: 337–349. doi. 10.1016/S0044-8486(00)00444-0
- Espigares F, Rocha A, Gómez A, Carrillo M, Zanuy S (2017) Photoperiod modulates the reproductive axis of European sea bass through regulation of kiss1 and gnrh2 neuronal expression, *General and Comparative Endocrinology*, Volume 240,1, Pages 35-45. doi:10.1016/j.ygcen.2016.09.007
- Falcón J, Besseau L, Sauzet Sa, and Boeuf G (2007). Melatonin effects on the hypothalamo-pituitary axis in fish. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 18, 81-88. doi. 10.1016/j.tem.2007.01.002
- Falcón J, Migaud H, Muñoz-Cueto JA, and Carrillo M, (2010) Current Knowledge on the melatonin system in teleost fish., *Gen. Comp. Endocrinol.* doi. 10.1016/j.ygcen.2009.04.026
- Fanjul-Moles ML and López-Riquelme GO (2016) "Relationship between Oxidative Stress, Circadian Rhythms, and AMD," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 7420637, 18. doi:10.1155/2016/7420637
- FAO (2016) *The State of World Fisheries and Aquaculture 2016 (SOFIA)*. Rome, Italy; 2016 p. 200. Report No: I5555
- Fischer RM, Fontinha BM, Kirchmaier S, Steger J, Bloch S, Inoue D, et al. (2013) Co-expression of VAL- and TMT-Opsins uncovers ancient photosensory interneurons and motoneurons in the vertebrate brain. *PLoS Biol.* 11:e1001585 10.1371/journal.pbio.1001585
- FishBase (2016). World Wide Web Electronic Publication, eds R. Froese and D. Pauly. Available online at: <http://www.fishbase.org>, version (10/2016)
- Fonseca-Madrigal J, Navarro JC, Hontoria F, Tocher DR, Martínez-Palacios CA, Monroig O (2014) Diversification of substrate specificities in teleostei Fads2: characterization of  $\Delta 4$  and  $\Delta 6\Delta 5$  desaturases of *Chirostoma estor*. *J Lipid Res* 55:1408-1419. doi. 10.1194/jlr.M049791
- Foster, R.G. and Hankins, M.W. (2002). Non-rod, non-cone photoreception in the vertebrates. *Progress in Retinal and Eye Research* 21, 507-527. doi:10.1016/S1350-9462(02)00036-8
- Foster RG and Kreitzman L (2014) The rhythms of life: what your body clock means to you!. *Experimental Physiology*, 99: 599–606. doi:10.1113/expphysiol.2012.071118



- Fraikin GY, Strakhovskaya MG, Belenikina NS et al. (2015) Bacterial Photosensory Proteins: Regulatory Functions and Optogenetic Applications *Microbiol*, 84: 461. doi.10.1134/S0026261715040086
- Froehlich HE, Gentry RR, Rust MB, Grimm D, Halpern BS (2017) Public Perceptions of Aquaculture: Evaluating Spatiotemporal Patterns of Sentiment around the World. *PLoS ONE* 12(1): e0169281. doi.10.1371/journal.pone.0169281
- Fu L and Lee CC (2003) The circadian clock: pacemaker and tumour suppressor *Nature Reviews Cancer* 3, 350-361. doi.10.1038/nrc1072
- Fujisawa K, Takami T, Kimoto Y, et al. (2016) Circadian variations in the liver metabolites of medaka (*Oryzias latipes*). *Sci Rep* 6:20916. doi.10.1038/srep20916
- Gachon F, Loizides-Mangold U, Petrenko V, Dibner C (2017) Glucose homeostasis: regulation by peripheral circadian clocks in rodents and humans. *Endo*, en.2017-00218. doi. 10.1210/en.2017-00218
- Gao Q, Zhou L, Yang S-Y, Cao J-M (2016) A novel role of microRNA 17-5p in the modulation of circadian rhythm. *Sci Rep*, 6:30070. doi.10.1038/srep30070
- Gavriouchkina D, Fischer S, Ivacevic T, Stolte J, Benes V, Dekens MPS (2010) Thyrotroph Embryonic Factor Regulates Light-Induced Transcription of Repair Genes in Zebrafish Embryonic Cells. *PLoS ONE* 5(9): e12542. doi.10.1371/journal.pone.0012542
- Gerkema MP (1992). Biological rhythms: mechanisms and adaptive values. In: *Rhythms in Fishes*, Ed. Ali, M.A., Plenum Publishing Corporation. New York, USA. pp.27-61. doi. 10.1007/978-1-4615-3042-8\_4
- Giles GI, Nasim MJ, Ali W, Jacob C (2017) The Reactive Sulfur Species Concept: 15 Years On. *Antioxidants (Basel)* 6(2). pii: E38. doi: 10.3390/antiox6020038
- Graham DM, Wong KY, Shapiro P, Frederick C, Pattabiraman K, Berson DM (2008) Melanopsin Ganglion Cells Use a Membrane-Associated Rhabdomic Phototransduction Cascade, *J of Neurophysiol*, 99 (5) 2522-2532. doi. 10.1152/jn.01066.2007
- Grimaldi B, Bellet MM, Katada S, Astarita G, Hirayama J, Amin RH, Granneman JG, Piomelli D, Leff T, Sassone-Corsi P (2010) PER2 controls lipid metabolism by direct regulation of PPAR $\gamma$ . *Cell Metab*. 12,5; 509–520. doi.10.1016/j.cmet.2010.10.005
- Hang CY, Kitahashi T, Parhar IS (2016) Neuronal Organization of Deep Brain Opsin Photoreceptors in Adult Teleosts. *Frontiers in Neuroanatomy*.10:48. doi:10.3389/fnana.2016.00048
- Hansen T, Karlsen O, Taranger GL, Hemre GI, Holm JC, et al. (2001) Growth, gonadal development and spawning time of Atlantic cod (*Gadus morhua*) reared under different photoperiods. *Aqua* 203: 51–67. doi. 10.1016/S0044-8486(01)00610-X
- He C, Wang J, Zhang Z, et al. (2016) Mitochondria Synthesize Melatonin to Ameliorate Its Function and Improve Mice Oocyte's Quality under in Vitro Conditions. *Int J Mol Sci*,17(6):939. doi.10.3390/ijms17060939
- Hernández-Pérez J, Míguez JM, Librán-Pérez M, Otero-Rodiño C, Naderi F, Soengas JL, López-Patiño MA (2015) Daily rhythms in activity and mRNA abundance of enzymes involved in glucose and lipid metabolism in liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Influence of light and food availability. *Chronobiol. Int.* 32, 1391–1408. doi.10.3109/07420528.2015.1100633
- Hirayama J, Cho S, Sassone-Corsi P (2007) Circadian control by the reduction/oxidation pathway: catalase represses light-dependent clock gene expression in the zebrafish. *PNAS*, 104:15747–15752. doi.10.1073/pnas.0705614104
- Hoyle NP and O'Neill JS (2015) Oxidation–Reduction Cycles of Peroxiredoxin Proteins and Nontranscriptional Aspects of Timekeeping. *Biochemistry*. 54(2):184-193. doi:10.1021/bi5008386
- Ishii M and Rohrer B. (2017) Bystander Effects elicited by single-cell photo-oxidative blue-light stimulation in retinal pigment epithelium cell networks. *Cell Death Discovery*. 2017;3:16071. doi.10.1038/cddiscovery.2016.71.
- Ishikawa-Fujiwara T, Shiraiishi E, Fujikawa Y, Mori T, Tsujimura T, Todo T (2017) Targeted Inactivation of DNA Photolyase Genes in Medaka Fish (*Oryzias latipes*). *Photochem Photobiol*, 93: 315–322. doi.10.1111/php.12658
- Isorna E, De Pedro N, Valenciano AI, Alonso-Gómez AL, Delgado MJ (2017) Interplay between the endocrine and circadian systems in fishes *J Endocrinol* (232) R141–R159. doi. 10.1530/JOE-16-0330
- Jones DP (2010) Redox sensing: orthogonal control in cell cycle and apoptosis signalling. *J Intern Med*. 268: 432–448. doi: 10.1111/j.1365-2796.2010.02268.x



- Jones DP, Sies H (2015) The Redox Code. *Antioxid Redox Signal* 23(9):734-746. doi:10.1089/ars.2015.6247
- Jung SJ, Kim NN, Choi YJ, et al. (2016<sup>a</sup>) Effects of melatonin and green-wavelength LED light on the physiological stress and immunity of goldfish, *Carassius auratus*, exposed to high water temperatura. *Fish Physiol Biochem* 42: 1335. doi:10.1007/s10695-016-0221-7
- Jung SJ, Choi YJ, Kim NN, Choi JY, Kim B-S, Choi CY (2016<sup>b</sup>) Effects of melatonin injection or green-wavelength LED light on the antioxidant system in goldfish (*Carassius auratus*) during thermal stress. *Fish & Shellfish Immun*, 52, 157-166. doi:10.1016/j.fsi.2016.03.002
- Kagawa Y (2012) From clock genes to telomeres in the regulation of the healthspan. *Nutr Rev*,70 (8): 459-471. doi: 10.1111/j.1753-4887.2012.00504.x
- Kaneko M, Hernandez-Borsetti N, Cahill GM (2006) Diversity of zebrafish peripheral oscillators revealed by luciferase reporting. *PNAS* 2006 103 (39) 14614-14619. doi:10.1073/pnas.0606563103
- Kawano-Yamashita E, Koyanagi M, Wada S, Tsukamoto H, Nagata T, Terakita A (2015) Activation of Transducin by Bistable Pigment Parapinopsin in the Pineal Organ of Lower Vertebrates. Garriga P, ed. *PLoS ONE*. 10(10):e0141280. doi:10.1371/journal.pone.0141280.
- Kennis JTM and Mathes T (2013) Molecular eyes: proteins that transform light into biological information. *Interface Focus* ,3(5):20130005. doi:10.1098/rsfs.2013.0005
- Kil IS, Lee SK, Ryu KW, Woo HA, Hu MC, Bae SH, Rhee SG (2012). Feedback Control of Adrenal Steroidogenesis via H2O2-Dependent, Reversible Inactivation of Peroxiredoxin III in Mitochondria *Mol. Cell* 46, 584–594. doi:10.1016/j.molcel.2012.05.030
- Kil IS, Ryu KW, Lee SK, Kim JY, Chu SY, Kim JH, Park S, Rhee SG (2015) Circadian Oscillation of Sulfiredoxin in the Mitochondria, *Molecular Cell*, 59,4, 651-663. doi:10.1016/j.molcel.2015.06.031
- Kim D-H, Rhee JC, Yeo S, et al. (2015) Crucial Roles of Mixed-Lineage Leukemia 3 and 4 as Epigenetic Switches of the Hepatic Circadian Clock Controlling Bile Acid Homeostasis in Mice. *Hepatology* 61(3):1012-1023. doi:10.1002/hep.27578
- Kim BH, Hur SP, Hur SW, Lee, CH., & Lee YD. (2016<sup>a</sup>). Relevance of Light Spectra to Growth of the Rearing Tiger Puffer Takifugu rubripes. *Development & Reproduction*, 20(1), 23–29. doi:10.12717/DR.2016.20.1.023
- Kim BM, Kim J, Choi IK, Raisuddin S, Au DWT, Leung KMY, Wu RSS, Rhee JS, Lee JS, (2016<sup>b</sup>) Omics of the marine medaka (*Oryzias melastigma*) and its relevance to marine environmental research, *Mar Env Res* 113;141-152. doi:10.1016/j.marenvres.2015.12.004
- Klein DC (2004) Theory of the origin of the pineal gland-A tale of conflict and resolution. *Journal of Biological Rhythms* 19, 264-279. doi: 10.1177/0748730404267340
- Kobayashi M, Msangi S, Batka M, Vannuccini S, Dey MM & Anderson JL (2015) Fish to 2030: The Role and Opportunity for Aquaculture, *Aquaculture Economics & Management*, 19:3, 282-300. doi:10.1080/13657305.2015.994240
- Kofuji P, Mure LS, Massman LJ, Purrier N, Panda S, Engeland WC (2016) Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells (ipRGCs) Are Necessary for Light Entrainment of Peripheral Clocks. *PLoS ONE* 11(12): e0168651. doi:10.1371/journal.pone.0168651
- Koike N, Yoo SH, Huang HC, Kumar V, Lee C, Kim TK, et al. (2012). Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals. *Science* 338, 349–354. doi: 10.1126/science.1226339
- Kolthur-Seetharam U, Dantzer F, McBurney MW, de Murcia G and Sassone-Corsi P (2006). Control of AIF-mediated cell death by the functional interplay of SIRT1 and PARP-1 in response to DNA damage. *Cell Cycle* 5, 873-877. doi: 10.4161/cc.5.8.2690
- Kondratov RV, Kondratova AA, Gorbacheva VY, Vykhovanets OV, Antoch MP (2006) Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. *Genes Dev* 20(14):1868–1873. doi: 10.1101/gad.1432206
- Korencic A, Borydyugov G, Kosir R, Rozman D, Golcnik M, et al. (2012) The Interplay of cis-Regulatory Elements Rules Circadian Rhythms in Mouse Liver. *PLoS ONE* 7(11): e46835. doi:10.1371/journal.pone.0046835
- Korf HW, Von Gall C, Stehle J (2003) The circadian system and melatonin: lessons from rats and mice. *Chronobiol Int* 20: 697–710. doi:10.1081/CBI-120022415



- Korsøen ØJ, Dempster T, Fosseidengen JE, Karlsen Ø, Oppedal F, Stien LH, Kristiansen TS (2013) Towards cod without spawning: artificial continuous light in submerged sea-cages maintains growth and delays sexual maturation for farmed Atlantic cod *Gadus morhua*. *Aquacult Environ Interact* 3:245-255. doi. 10.3354/aei00067
- Koyanagi M, Wada S, Kawano-Yamashita E, et al (2015) Diversification of non-visual photopigment parainopsin in spectral sensitivity for diverse pineal functions. *BMC Biology*.13:73. doi.10.1186/s12915-015-0174-9.
- Krishnaiah, Saikumari Y. et al. (2017) Clock Regulation of Metabolites Reveals Coupling between Transcription and Metabolism. *Cell Metabolism*, 25 (4) 961 - 974.e4. doi. 10.1016/j.cmet.2017.03.019
- Kumaki Y, Ukai-Tadenuma M, Uno KD, Nishio J, Masumoto K, Nagano M, Komori T, Shigeyoshi Y, Hogenesch JB & Ueda HR (2008) Analysis and synthesis of high-amplitude cis-elements in the mammalian circadian clock. *PNAS*, 105: 14946-14951. doi.10.1073/pnas.0802636105
- Kumar PJ, Challet E, Kalsbeek A (2015) Circadian rhythms in glucose and lipid metabolism in nocturnal and diurnal mammals, *Mol and Cell Endo*, 418;1:74-88. doi.org/doi: 10.1016/j.mce.2015.01.024
- Kuse Y, Ogawa K, Tsuruma K, Shimazawa M, Hara H (2014) Damage of photoreceptor-derived cells in culture induced by light emitting diode-derived blue light. *Sci Rep*.4:5223. doi.10.1038/srep05223
- Kwasek K, Rimoldi S, Cattaneo AG et al. (2017). The expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  gene is not affected by low-oxygen conditions in yellow perch (*Perca flavescens*) juveniles. *Fish Physiol Biochem*. doi.10.1007/s10695-017-0340-9
- Labunskyy VM, Hatfield DL, Gladyshev VN (2014) Selenoproteins: Molecular Pathways and Physiological Roles. *Physiol Rev*. 94(3):739-777. doi:10.1152/physrev.00039.2013
- Lamb TD, Patel H, Chuah A, et al. (2016) Evolution of Vertebrate Phototransduction: Cascade Activation. *Mol Biol and Evo*. 33(8):2064-2087. doi.10.1093/molbev/msw095
- Landgraf D, Wang LL, Diemer T, Welsh DK (2016) NPAS2 Compensates for Loss of CLOCK in Peripheral Circadian Oscillators. *PLoS Genet* 12(2): e1005882. doi.10.1371/journal.pgen.1005882
- Larson ET, Winberg S, Mayer I, Lepage O, Summers CH, Øverli Ø (2004) Social stress affects circulating melatonin levels in rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol*. 136, 322–327. doi. 10.1016/j.ygcen.2004.01.005
- Lazado CC, Kumaratunga HPS, Nagasawa K, Babiak I, Giannetto A, Fernandes JMO (2014) Daily Rhythmicity of Clock Gene Transcripts in Atlantic Cod Fast Skeletal Muscle. *Oster H, ed. PLoS ONE*, 9(6):e99172. doi.10.1371/journal.pone.0099172
- Li J-Y, Patterson M, Mikkola HKA, Lowry WE, Kurdistani SK (2012) Dynamic Distribution of Linker Histone H1.5 in Cellular Differentiation. *PLoS Genet* 8(8): e1002879. doi.10.1371/journal.pgen.1002879
- Lima-Cabello E, Díaz-Casado ME, Guerrero JA, Otalora BB, Escames G, López LC, Reiter RJ and Acuña-Castroviejo D (2014) A review of the melatonin functions in zebrafish physiology. *J Pineal Res*, 57: 1–9. doi.10.1111/jpi.12149
- Liu C, Li S, Liu T, Borjigin J, Lin JD (2007) Transcriptional coactivator PGC-1 $\alpha$  integrates the mammalian clock and energy metabolism. *Nature* 447, 477–481. doi. 10.1038/nature05767
- Liu S, Evans RM (2014) Metabolism: Tick, tock, a high-fat clock, *Nature Rev Endo*, 10, 191–192. doi.10.1038/nrendo.2014.23
- López-Olmeda JF, Madrid JA, Sánchez-Vázquez FJ (2006) Light and temperature cycles as zeitgebers of zebrafish (*Danio rerio*) circadian activity rhythms. *Chronobiol. Int*. 23, 537–550. doi.org/10.1080/07420520600651065
- López-Olmeda JF, Sánchez-Vázquez FJ (2010) Feeding Rhythms in Fish: From Behavioural to Molecular Approach. In: Kulczykowska, E., Popek, W., Kapoor, B.G. (Eds.), *Biological Clock in Fish*. Science Publishers, Enfield, USA, pp. 155–184. doi. 10.1201/b10170-9
- López-Olmeda JF (2017) Nonphotic entrainment in fish. *Comp Biochem and Physiol, Part A* 203:133–143. doi.10.1016/j.cbpa.2016.09.006
- López-Patiño MA, Gesto M, Conde-Sieira M, Soengas JL, Míguez JM (2014) Stress inhibition of melatonin synthesis in the pineal organ of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is mediated by cortisol. *J Exp Biol*. 217: 1407-1416; doi: 10.1242/jeb.087916
- Losi A, and Gartner W (2011) Old chromophores, new photoactivation paradigms, trendy applications: flavins in blue light-sensing photoreceptors. *Photochem. Photobiol*. 87, 491–510. doi. 10.1111/j.1751-1097.2011.00913.x
- Losi A, and Gartner W (2012) The evolution of flavin-binding photoreceptors: an ancient chromophore serving trendy blue-light sensors. *Annu. Rev. Plant Biol*. 63, 49–72. doi. 10.1146/annurev-arplant-042811-105538



- Maitra, SK, and Hasan, KN (2016). The Role of Melatonin as a Hormone and an Antioxidant in the Control of Fish Reproduction. *Frontiers in Endocrinology*, 7, 38. doi:10.3389/fendo.2016.00038
- Malmstrom M, Matschiner M, Torresen OK, Star B, Snipen LG., et al. (2016) Evolution of the immune system influences speciation rates in teleost fishes. *Nat Genet.* 48(10):1204–1210. doi:10.1038/ng.3645
- Manchester LC, Coto-Montes A, Boga JA, Andersen LPH, Zhou Z, Galano A, Vriend J, Tan D-X and Reiter RJ (2015) Melatonin: an ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable. *J. Pineal Res.*, 59: 403–419. doi:10.1111/jpi.12267
- Martín-Robles AJ, Aliaga-Guerrero M, Whitmore D, Pendón D, and Muñoz-Cueto JA (2012) The Circadian Clock Machinery During Early Development of Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Effects of Constant Light and Dark Conditions. *Chron Int* 29:9,1195-1205. doi:10.3109/07420528.2012.719963
- Martínez-Chávez CC, Tello-Ballinas A, Fonseca-Madrigal J, Ross LG, Martínez-Palacios CA (2014). Photoperiodic growth enhancement in a tropical batch spawning atherinopsid, pike silverside *Chirostoma estor*. *Journal of Fish Biology*, 85: 546–553. doi:10.1111/jfb.12442
- Martínez-Palacios CA, Ross LG, Racotta-Dimitrov I, Ríos Durán MG, Palacios Metchenov E, Toledo Cuevas M, Ross LG (2006). Advances in applied research for the culture of Mexican silversides (*Chirostoma*, *Atherinopsidae*). *BIOCELL*. 30: (1), 137-148
- Martínez-Palacios CA, Chávez-Sosa JC, Santoyo-Guzmán VO, Campos-Mendoza A, Martínez-Chavez CC, Ross LG (2007). The effect of photoperiod on the reproduction of *Chirostoma estor estor* Jordan 1879 from Lago de Pátzcuaro, Mexico. *J of App Ichth*. 23:(5) 621-623. doi:10.1111/j.1439-0426.2007.00856.x
- Masri S, Patel VR, Eckel-Mahan KL, et al. (2013) Circadian acetylome reveals regulation of mitochondrial metabolic pathways. *PNAS*. 110(9):3339-3344. doi:10.1073/pnas.1217632110.
- Masri S, Rigor P, Cervantes M, Ceglia N, Sebastian C, Xiao C, Roqueta-Rivera M, Deng C, Osborne TF, Mostoslavsky R, Baldi P, Sassone-Corsi P (2014) Partitioning Circadian Transcription by SIRT6 Leads to Segregated Control of Cellular Metabolism. *Cell* 158-3,659-672. doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.050.
- Masri S, Orozco-Solis R, Aguilar-Arnal L, Cervantes M, Sassone-Corsi P (2015) Coupling Circadian Rhythms of Metabolism and Chromatin Remodeling. *Diabetes Obes Metab*, 17(0 1):17-22. doi:10.1111/dom.12509
- Massudi H, Grant R, Guillemin GJ, Braidy N (2012) NAD<sup>+</sup> metabolism and oxidative stress: the golden nucleotide on a crown of thorns. *Redox Report* 17(1): 28-46. doi:10.1179/1351000212Y.0000000001
- Mata-Sotres JA, Martínez-Rodríguez G, Pérez-Sánchez J, Sánchez-Vázquez FJ & Yúfera M (2015) Daily rhythms of clock gene expression and feeding behavior during the larval development in gilthead seabream, *Sparus aurata*, *Chrono Int*, 32:8, 1061-1074. doi:10.3109/07420528.2015.1058271
- Mata-Sotres JA, Moyano FJ, Martínez-Rodríguez G, Yúfera M (2016) Daily rhythms of digestive enzyme activity and gene expression in gilthead seabream (*Sparus aurata*) during ontogeny, *Comp Biochem and Physio Part A: Mol & Int Physio*, 197,43-51. doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.03.010
- Matos-Cruz V, Blasic J, Nickle B, Robinson PR, Hattar S, Halpern ME (2011) Unexpected diversity and photoperiod dependence of the zebrafish melanopsin system. *PLoS ONE* 6:e25111 10.1371/journal.pone.0025111
- Matsumoto CS, Almeida LO, Guimarães DM, et al. (2016) PI3K-PTEN dysregulation leads to mTOR-driven upregulation of the core clock gene BMAL1 in normal and malignant epithelial cells. *Oncotarget*,7(27):42393-42407. doi:10.18632/oncotarget.9877
- Mavroudis PD, Scheff JD, Calvano SE, Lowry SF, Androulakis IP (2012) Entrainment of peripheral clock genes by cortisol. *Physiological Genomics*, 44(11):607-621. doi:10.1152/physiolgenomics.00001.2012.
- Mayo JC, Sainz RM, González Menéndez P, Cepas V, Tan D-X, Reiter RJ (2017) Melatonin and sirtuins: A “not-so unexpected” relationship. *J Pineal Res.* 62:e12391. doi./10.1111/jpi.12391
- Maywood ES, et al. (2011) Tuning the period of the mammalian circadian clock: Additive and independent effects of CK1εTau and Fbxl3Afh mutations on mouse circadian behavior and molecular pacemaking. *J Neurosci* 31(4):1539–1544. doi:10.1523/JNEUROSCI.4107-10.2011
- McKenzie DJ, et al. (2016) Conservation physiology of marine fishes: state of the art and prospects for policy. *Conserv Physiol* 4(1)046. doi:10.1093/conphys/cow046
- Mello T, Materozzi M, Galli A (2016) PPARs and Mitochondrial Metabolism: From NAFLD to HCC. *PPAR Res.* 2016:7403230. doi:10.1155/2016/7403230



- Menaker M, Moreira LF and Tosini G (1997) Evolution of circadian organization in vertebrates. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 30, 305-313. doi.10.1590/S0100-879X1997000300003
- Mendoza-Viveros L, Bouchard-Cannon P, Hegazi S. et al. (2017) Molecular modulators of the circadian clock: lessons from flies and mice, *Cell Mol Life Sci*, 74: 1035. doi.10.1007/s00018-016-2378-8
- Meng QJ, et al. (2008) Setting clock speed in mammals: The CK1 epsilon tau mutation in mice accelerates circadian pacemakers by selectively destabilizing PERIOD proteins. *Neuron* 58(1):78–88. doi. 10.1016/j.neuron.2008.01.019
- Micó V, Díez-Ricote L, Daimiel L. (2016) Nutrigenetics and Nutrimomics of the Circadian System: The Time for Human Health *Int J Mol Sci*. 17(3):299. doi.10.3390/ijms17030299
- Migaud H., Taylor JF., Taranger GL., Davie A., Cerdá-Reverter JM., Carrillo M., Hansen T., Bromage NR., (2006) A comparative ex vivo and in vivo study of day and night perception in teleosts species using the melatonin rhythm. *J. Pineal Research* 41(1); 42-52. doi. 10.1111/j.1600-079X.2006.00330.x
- Migaud, H., Davie, A., Martínez-Chávez, CC., Al-Khamees, S. (2007a) Evidence for differential photic regulation of pineal melatonin synthesis in teleosts. *Journal of Pineal Research* Vol 43; Issue4, 327-335. doi. 10.1111/j.1600-079X.2007.00480.x
- Migaud H, Cowan M, Taylor J, Ferguson HW (2007b) The effect of spectral composition and light intensity on melatonin, stress and retinal damage in post-smolt Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aqua* 270 390–404. doi. 10.1016/j.aquaculture.2007.04.064
- Migaud H, Davie A, Taylor JF (2010) Current knowledge on the photoneuroendocrine regulation of reproduction in temperate fish species *Journal of Fish Biology* 76, 27–68. doi.10.1111/j.1095-8649.2009.02500.x
- Milev NB, Rey G, Valekunja UK, Edgar RS, O'Neill JS, Reddy AB. (2015) Analysis of the redox oscillations in the circadian clockwork. *Meth Enz*, 552:185-210. doi.10.1016/bs.mie.2014.10.007
- Milev NB and Reddy AB (2015) Circadian redox oscillations and metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 26,8: 430-437. doi. 10.1016/j.tem.2015.05.012
- Mistlberger RE (2009) Food-anticipatory circadian rhythms: concepts and methods. *Eur. J. Neurosci*. 30, 1718–1729. doi.10.1111/j.1460-9568.2009.06965.x
- Mogi M, Uji S, Yokoi H Suzuki T (2015) Early development of circadian rhythmicity in the suprachiasmatic nuclei and pineal gland of teleost, flounder (*Paralichthys olivaceus*), embryos. *Develop. Growth Differ*, 57: 444–452. doi.10.1111/dgd.12222
- Mogi M, Yokoi H, Suzuki T (2017) Analyses of the cellular clock gene expression in peripheral tissue, caudal fin, in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, *Gen Comp Endo* .doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.02.009
- Montoya A, López-Olmeda JF, Yúfera M, Sánchez-Muros MJ, Sánchez-Vázquez FJ (2010). Feeding time synchronises daily rhythms of behaviour and digestive physiology in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aqua* 306, 315–321. doi.10.1016/j.aquaculture.2010.06.023
- Moore RY (2013) The suprachiasmatic nucleus and the circadian timing system. *Prog Mol Biol Transl Sci* 119: 1–28. doi.10.1016/B978-0-12-396971-2.00001-4
- Moore HA, Whitmore D (2014) Circadian Rhythmicity and Light Sensitivity of the Zebrafish Brain. *Ebihara S, ed. PLoS ONE*. 2014;9(1):e86176. doi.10.1371/journal.pone.0086176
- Morshedien A and Fain GL (2017) The evolution of rod photoreceptors. *Phil. Trans. R. Soc. B* 372: 20160074. doi.10.1098/rstb.2016.0074
- Nagasawa K, Giannetto A, Fernandes JMO (2012) Photoperiod Influences Growth and *mll* (Mixed-Lineage Leukaemia) Expression in Atlantic Cod. *PLoS ONE* 7(5): e36908. doi.10.1371/journal.pone.0036908
- Nakahata Y and Bessho Y (2016) The Circadian NAD<sup>+</sup> Metabolism: Impact on Chromatin Remodeling and Aging. *BioMed Res Int*. 2016:3208429. doi.10.1155/2016/3208429.
- Nakanishi-Ueda T, Majima HJ, Watanabe K, Ueda T, Indo HP, Suenaga S et al (2013) Blue LED light exposure develops intracellular reactive oxygen species, lipid peroxidation, and subsequent cellular injuries in cultured bovine retinal pigment epithelial cells. *Free Radic Res* 2013; 47: 774–780. doi. 10.3109/10715762.2013.829570
- Nakashima Y, Ohta S, Wolf AM (2017) Blue light-induced oxidative stress in live skin, *Free Rad Biol Med*, ISSN 0891-5849. doi.10.1016/j.freeradbiomed.2017.03.010
- Nelson, J. S. (2006). *Fishes of the World*. New Jersey, NJ: John Wiley & Sons



- Nikaido Y, Aluru N, McGuire A, Park YJ, Vijayan MM, Takemura A (2010). Effect of cortisol on melatonin production by the pineal organ of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 155 84–90. doi. 10.1016/j.cbpa.2009.10.006
- Nisembaum LG, De Pedro N, Delgado MJ, Sánchez-Bretaña A, Isorna E (2014) Orexin as an input of circadian system in goldfish: Effects on clock gene expression and locomotor activity rhythms, *Peptides*, 52,29-37. doi.10.1016/j.peptides.2013.11.014
- Nisembaum LG, Besseau L, Paulin C-H, Charpantier A, Martin P, Magnanou E, Fuentès M, Delgado M-J, Falcón J (2015) In the Heat of the Night: Thermo-TRPV Channels in the Salmonid Pineal Photoreceptors and Modulation of Melatonin Secretion. *Endo.* 156 (12): 4629-4638. doi. 10.1210/en.2015-1684
- Nishiwaki-Ohkawa T and Yoshimura T (2016) Molecular basis for regulating seasonal reproduction in vertebrates. *Journal of Endocrinology* 229 R117–R127. doi.10.1530/JOE-16-0066
- O'Neill JS, Maywood ES, Chesham JE, Takahashi JS, Hastings MH (2008) cAMP-Dependent Signalling as a Core Component of the Mammalian Circadian Pacemaker. *Science* 320 (5878) : 949-953 .doi.10.1126/science.1152506
- O'Neill JS, van Ooijen G, Dixon LE, et al. (2011) Circadian rhythms persist without transcription in a eukaryote. *Nature*, 469(7331):554-558. doi.10.1038/nature09654
- O'Neill JS and Reddy AB (2011) Circadian Clocks in Human Red Blood Cells *Nature*. 469 (7331):498-503. doi.10.1038/nature09702
- O'Neill JS and Reddy AB (2012) The essential role of cAMP/Ca<sup>2+</sup> signalling in mammalian circadian timekeeping, *Biochem Soc Transac* 40 (1) 44-50. doi. 10.1042/BST20110691
- Oka S-I, Hsu C-P, Sadoshima J (2012) Regulation of Cell Survival and Death by Pyridine nucleotides. *Pyr Nuc Cir Res.*111:611-627. doi.10.1161/CIRCRESAHA.111.247932
- Okuno Y, Matsuda M, Miyata Y et al. (2010) Human catalase gene is regulated by peroxisome proliferator activated receptor-gamma through a response element distinct from that of mouse. *Endo J.*, 57,4; 303–309, doi.10.1507/endocrj.K09E-113
- Oliveira CCV, Aparicio R, Blanco-Vives B, Chereguini O, Martín I, Sánchez-Vázquez FJ (2013) Endocrine (plasma cortisol and glucose) and behavioral (locomotor and self-feeding activity) circadian rhythms in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858) exposed to light/dark cycles or constant light. *Fish Physiol. Biochem.* 39, 479–487. doi.10.1007/s10695-012-9713-2
- Pando MP and Sassone-Corsi P (2002) Unraveling the mechanisms of the vertebrate circadian clock: zebrafish may light the way. *BioEssays* 24, 419–426. doi.10.1002/bies.10091
- Papazyan R, Zhang Y, Lazar MA (2016) Genetic and epigenomic mechanisms of mammalian circadian transcription *Nature Struc & Mol Biol* 23, 1045–1052. doi.10.1038/nsmb.3324
- Paredes JF, López-Olmeda JF, Martínez FJ, Sánchez-Vázquez FJ (2015) Daily rhythms of lipid metabolic gene expression in zebra fish liver: response to light/dark and feed- ing cycles. *Chronobiol. Int.* 32, 1438–1448. doi.10.3109/07420528.2015.1104327
- Paschos GK (2015) Circadian clocks, feeding time, and metabolic homeostasis. *Frontiers in Pharmacology.* 6:112. doi:10.3389/fphar.2015.00112
- Pauly D and Zeller D (2016) Catch reconstructions reveal that global marine fisheries catches are higher than reported and declining. *Nat Commun.*; 7: 10244. doi. 10.1038/ncomms10244
- Peyric E, Moore HA, Whitmore D (2013) Circadian Clock Regulation of the Cell Cycle in the Zebrafish Intestine. *Tosini G, ed. PLoS ONE.* 2013;8(8):e73209. doi.10.1371/journal.pone.0073209
- Pitman K, Yufera M., Pavlidis M., Geffen A.J., Koven W., Ribeiro L., Zambonino-Infante J.L., Tandler A. (2013) Fantastically plastic: fish larvae equipped for a new world. *Reviews in Aquaculture* 5, S224–S267. doi. 10.1111/raq.12034
- Pokorny R, Klar T, Hennecke U, Carell T, Batschauer A, Essen L-O (2008) Recognition and repair of UV lesions in loop structures of duplex DNA by DASH-type cryptochrome. *PNAS*, 105(52):21023-21027. doi.10.1073/pnas.0805830106
- Poletto JB, Cocherell DE, Baird SE, et al. (2017) Unusual aerobic performance at high temperatures in juvenile Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Con Phys.* 5(1):cow067. doi:10.1093/conphys/cow067
- Polvani S, Tarocchi M, Galli A (2012) "PPAR and Oxidative Stress: Con(B) Catenating NRF2 and FOXO," *PPAR Res.* 641087,15. doi.10.1155/2012/641087



- Pörtner HO and Farrell AP (2008) Physiology and climate change. *Science* 322: 690–692. doi:10.1126/science.1163156
- Provencio I and Warthen DM (2012) Melanopsin, the photopigment of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *WIREs Membr Transp Signal*, 1: 228–237. doi:10.1002/wmts.29
- Purushothaman S, Saxena S, Meghah V, Meena Lakshmi MG, Singh SK, Brahmendra Swamy CV and Idris MM (2015) Proteomic and gene expression analysis of zebrafish brain undergoing continuous light/dark stress. *J Sleep Res*, 24: 458–465. doi:10.1111/jsr.12287
- Putker M, O'Neill JS (2016) Reciprocal Control of the Circadian Clock and Cellular Redox State - a Critical Appraisal. *Mol and Cells*, 39(1):6-19. doi:10.14348/molcells.2016.2323
- Quinlan CL, Goncalves RLS, Hey-Mogensen M, Yadava N, Bunik VI, and Brand MD (2014) The 2-oxoacid dehydrogenase complexes in mitochondria can produce superoxide/ hydrogen peroxide at much higher rates than complex I. *J Biol Chem*. 289: 8312–8325. doi: 10.1074/jbc.M113.545301
- Ramos BCR, Moraes MNM, Poletini MO, Lima LHRG, Castrucci AML (2015) From Blue Light to Clock Genes in Zebrafish ZEM-2S Cells. Bertolucci C, ed. *PLoS ONE*. 2014;9(9):e106252. doi:10.1371/journal.pone.0106252.
- Ray S and Reddy AB (2016) Cross-talk between circadian clocks, sleep-wake cycles, and metabolic networks: Dispelling the darkness, *Bioessays*; 38(4):394-405. doi:10.1002/bies.201500056
- Reiter RJ, Paredes SD, Manchester LC, Tan DX (2009) Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly- discovered genre for melatonin. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 44: 175–200. doi: 10.1080/10409230903044914
- Reiter RJ, Tan DX, Galano A (2014) Melatonin: Exceeding Expectations, *Physiology*, 29 (5) 325-333. doi. 10.1152/physiol.00011.2014
- Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB (2010) Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?, *Free Radical Biology and Medicine*, 49,11;1603–1616. doi. 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006
- Rey G and Reddy AB (2015), Interplay between cellular redox oscillations and circadian clocks. *Diabetes Obes Metab*, 17: 55–64. doi:10.1111/dom.12519
- Rey G, Valekunja UK, Feeney KA, et al. (2016) The Pentose Phosphate Pathway Regulates the Circadian Clock. *Cell Metabol* 2016;24(3):462-473. doi:10.1016/j.cmet.2016.07.024
- Rhee SG and Kil IS (2016) Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signaling is controlled by the concerted action of peroxiredoxin III and sulfiredoxin: Linking mitochondrial function to circadian rhythm, *Free Rad Biol and Med*, 99,120, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.07.029
- Rhee SG and Kil IS (2017) Multiple Functions and Regulation of Mammalian Peroxiredoxins, *Ann Rev of Biochem* 86. doi. 10.1146/annurev-biochem-060815-014431
- Ross LG, Aguilar Valdez MC, Martínez-Palacios CA, Beveridge MCM, Chavez Sanchez MC (2006) Determination of feeding mode in fish: the importance of using structural and functional feeding studies in conjunction with gut analysis in a selective zooplanktivore *Chirostoma estor estor* Jordan 1880. *J Fish Biol*. 68: 1782-1794. doi:10.1111/j.1095-8649.2006.01061.x
- Rytönen KT and Storz JF (2011) Evolutionary origins of oxygen sensing in animals. *EMBO Rep*. 12: 3–4. doi:10.1038/embor.2010.192
- Saito D, Shi Q, Ando H, Urano A (2004) Attenuation of diurnal rhythms in plasma levels of melatonin and cortisol, and hypothalamic contents of vasotocin and isotocin mRNAs in pre-spawning chum salmon. *Gen. Comp. Endocrinol*. 137, 62–68. doi. 10.1016/j.ygcen.2004.02.010
- Sakamaki T, Casimiro MC, Ju X, Quong AA, Katiyar S, Liu M, Jiao X, Li A, et al. (2006) Cyclin D1 determines mitochondrial function in vivo. *Mol Cell Biol*. 26: 5449–5469. doi:10.1128/MCB.02074-05
- Sánchez-Bretaña A, Callejo M, Montero M et al. (2016) Performing a hepatic timing signal: glucocorticoids induce *gper1a* and *gper1b* expression and repress *gclock1a* and *gbmal1a* in the liver of goldfish. *J Comp Physiol B*, 186: 73. doi:10.1007/s00360-015-0936-2
- Sassone-Corsi P (2012) Minireview: NAD<sup>+</sup>, a circadian metabolite with an epigenetic twist. *Endo*. 153: 1–5. doi: 10.1210/en.2011-1535
- Sato K, Yamashita T, Haruki Y, Ohuchi H, Kinoshita M, Shichida Y (2016) Two UV-Sensitive Photoreceptor Proteins, *Opn5m* and *Opn5m2* in Ray-Finned Fish with Distinct Molecular Properties and Broad Distribution in the Retina and Brain. Bertolucci C, ed. *PLoS ONE*;11(5):e0155339. doi:10.1371/journal.pone.0155339
- Scheiermann C, Kunisaki Y, Frenette PS (2013) Circadian control of the immune system, *Nat Rev Immunol*, 13(3): 190–



198. doi:10.1038/nri3386

- Schick S, Becker K, Thakurela S, et al. (2016) Identifying Novel Transcriptional Regulators with Circadian Expression. *Mol and Cell Biol*, 36(4):545-558. doi:10.1128/MCB.00701-15
- Searchinger T, Hanson C, Ranganathan J, Lipinski B, Waite R, Winterbottom R, Dinshaw A, Heimlich R (2014) Creating a Sustainable Food Future: Interim Findings A menu of solutions to sustainably feed more than 9 billion people by 2050, World Resources Institute [http://www.wri.org/sites/default/files/wri13\\_report\\_4c\\_wrr\\_online.pdf](http://www.wri.org/sites/default/files/wri13_report_4c_wrr_online.pdf)
- Selby CP and Sancar A. (2006) A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity. *PNAS*, 103(47):17696-17700. doi:10.1073/pnas.0607993103
- Semchyshyn HM (2014) Reactive Carbonyl Species In Vivo: Generation and Dual Biological Effects. *Sci World J*. 2014:417842. doi:10.1155/2014/417842
- Shapiro JA (1998) Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annu Rev Microbiol*, 52:81–104. doi: 10.1146/annurev.micro.52.1.81
- Shichida Y and Yamashita T. (2003) Diversity of visual pigments from the viewpoint of G protein activation—comparison with other G protein-coupled receptors. *Photochem Photobiol Sci*, 2:1237–1246
- Shin HS, Lee J, Choi CY (2011) Effects of LED light spectra on oxidative stress and the protective role of melatonin in relation to the daily rhythm of the yellowtail clownfish, *Amphiprion clarkii*, *Comp Biochem and Physio Part A: Mol & Int Physio*, 160,2 221-228. doi:10.1016/j.cbpa.2011.06.002
- Shin SS, Habibi HR, Choi CY (2014) The environmental regulation of maturation in goldfish, *Carassius auratus*: Effects of various LED light spectra. *Comp Biochem and Phys Part A*. 168, 17–24. doi. 10.1016/j.cbpa.2013.11.003
- Sies H (1985) *Oxidative Stress*, Academic Press, London, 1985, pp. 1–507
- Sies H (2015) Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol*. 4:180-183. doi:10.1016/j.redox.2015.01.002
- Sies H, Berndt C, Jones DP (2017) *Oxidative Stress*. *Annu Rev Biochem*, 86:25.1–25.34. doi:10.1146/annurev-biochem-061516-045037
- So AY-L, Bernal TU, Pillsbury ML, Yamamoto KR, Feldman BJ (2009) Glucocorticoid regulation of the circadian clock modulates glucose homeostasis, *PNAS*, 106(41):17582-17587. doi.10.1073/pnas.0909733106
- Sovrano VA, Bertolucci C, Frigato E, Foà A, Rogers LJ (2016) Influence of exposure in ovo to different light wavelengths on the lateralization of social response in zebrafish larvae, *Physio & Behav*,157,258-264. doi.10.1016/j.physbeh.2016.02.016
- Spang A, Saw JH, Jørgensen SL, et al. (2015) Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Nature*, 521(7551):173-179. doi:10.1038/nature14447
- Spudich JL, Yang CS, Jung KH, Spudich EN (2000) Retinylidene proteins: structures and functions from archaea to humans. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 16:365–392. doi.10.1146/annurev.cellbio.16.1.365
- Spudich JL. The multitasking microbial sensory rhodopsins (2006) *Trends Microbiol*. 14:480–487. doi. 10.1016/j.tim.2006.09.005
- St. John, Hirota T, Kay SA, Doyle III FJ (2014) Spatiotemporal separation of PER and CRY posttranslational regulation in the mammalian circadian clock *PNAS* 2014 111 (5) 2040-2045. doi.10.1073/pnas.1323618111
- Stangherlin A and Reddy AB (2013) Regulation of Circadian Clocks by Redox Homeostasis. *The Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(37):26505-26511. doi.10.1074/jbc.R113.457564
- Storch KF and Weitz CJ (2009) Daily rhythms of food-anticipatory behavioural activity do not require the known circadian clock. *PNAS*. 106, 6808–6813. doi: 10.1073/pnas.0902063106
- Sun Y, Huang Y, Li X, et al. (2016) Fish-T1K (Transcriptomes of 1,000 Fishes) Project: large-scale transcriptome data for fish evolution studies. *GigaScience* 5:18. doi.10.1186/s13742-016-0124-7
- Tahara Y, Aoyama S, Shibata S (2017). The mammalian circadian clock and its entrainment by stress and exercise. *The Journal of Physiological Sciences*. 67(1):1-10. doi:10.1007/s12576-016-0450-7
- Takahashi JS, Hong H-K, Ko CH, McDearmon E.L.(2008) The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease *Nature Reviews Genetics* 9, 764-775. doi. 10.1038/nrg2430



- Takahashi A, Kasagi S, Murakami N, Furufuji S, Kikuchi S, Mizusawa K, Andoh T (2016) Chronic effects of light irradiated from LED on the growth performance and endocrine properties of barfin flounder *Verasper moseri*, Gen Comp Endo, 232, 101-108. doi.10.1016/j.ygcen.2016.01.008
- Takahashi JS (2016) Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock, Nat Rev Gen. 18(3): 164–179 doi:10.1038/nrg.2016.150
- Takano A, Isojima Y, Nagai K (2004) Identification of mPer1 phosphorylation sites responsible for the nuclear entry. J Biol Chem 279(31):32578–32585. doi.10.1074/jbc.M403433200
- Takeuchi Y, Imamura S, Sawada Y, Hur S-P, Takemura A (2014) Effects of different colors of light on melatonin suppression and expression analysis of Aanat1 and melanosin in the eye of a tropical damselfish, Gen and Comp Endo, 204,158-165. doi.org.10.1016/j.ygcen.2014.05.015.
- Tan DX, Manchester LC, Liu X, Rosales-Corral SA, Acuna-Castroviejo D, Reiter RJ. (2013) Mitochondria and chloroplasts as the original sites of melatonin synthesis: a hypothesis related to melatonin's primary function and evolution in eukaryotes. J Pi- neal Res 54: 127–138
- Tan D-X, Manchester LC, Esteban-Zubero E, Zhou Z, Reiter RJ (2015) Melatonin as a Potent and Inducible Endogenous Antioxidant: Synthesis and Metabolism. Mol 20, 18886-18906. doi.10.3390/molecules201018886
- Tan D-X, Manchester LC, Qin L, Reiter RJ (2016) Melatonin: A Mitochondrial Targeting Molecule Involving Mitochondrial Protection and Dynamics. Lamuela-Raventós RM, ed. Int J of Mol Sci,17(12):2124. doi.10.3390/ijms17122124
- Tanoue S, Fujimoto K, Myung J, Hatanaka F, Kato Y, Takumi T (2015) DEC2–E4BP4 Heterodimer Represses the Transcriptional Enhancer Activity of the EE Element in the Per2 Promoter. Front in Neurol, 6;166. doi.10.3389/fneur.2015.00166
- Tarttelin EE, Fransén MP, Edwards PC, et al. (2011) Adaptation of pineal expressed teleost exo-rod opsin to non-image forming photoreception through enhanced Meta II decay. Cellular and Molecular Life Sciences. 2011;68(22):3713-3723. doi.10.1007/s00018-011-0665-y
- Tessmar-Raible K, Raible F, Arboleda E (2011) Another place, another timer: marine species and the rhythms of life. BioEssays 33, 165–172. doi. 10.1002/bies.201000096
- Tinoco AB, Nisembaum LG, De Pedro N, Delgado MJ, Isorna E (2014) Leptin expression is rhythmic in brain and liver of goldfish (*Carassius auratus*). Role of feeding time. Gen. Comp. Endocrinol. 204, 239–247. doi.10.1016/j.ygcen.2014.06.006
- Toledano MB and Delaunay-Moisán A (2015) Keeping Oxidative Metabolism on Time: Mitochondria as an Autonomous Redox Pacemaker Animated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Peroxiredoxin, Mol Cell, 59, 4-20, 517-519. doi.10.1016/j.molcel.2015.08.003
- Morris T (2017) Environmental Biology: Interactions between the planet and life. Fullerton College [http://morriscourse.com/environmental\\_bio\\_lecture.html](http://morriscourse.com/environmental_bio_lecture.html)
- Touitou Y, Reinberg A, Touitou D (2017) Association between light at night, melatonin secretion, sleep deprivation, and the internal clock: Health impacts and mechanisms of circadian disruption, Life Sciences, Available online 16 February 2017, ISSN 0024-3205. doi.10.1016/j.lfs.2017.02.008.
- Ukai H and Ueda HR (2010). Systems biology of mammalian circadian clocks. Annu. Rev. Physiol. 72, 579–603. doi. 10.1146/annurev-physiol-073109-130051
- Valekunja UK, Edgar RS, Oklejewicz M, et al. (2013) Histone methyltransferase MLL3 contributes to genome-scale circadian transcription. PNAS ,110(4):1554-1559. doi.10.1073/pnas.1214168110
- Van Moorsel D, Hansen J, Havekes B, et al. (2016) Demonstration of a day-night rhythm in human skeletal muscle oxidative capacity. Mol Metab, 5(8):635-645. doi.10.1016/j.molmet.2016.06.012
- Vartanian GV, Li BY, Chervenak AP, et al. (2015) Melatonin suppression by light in humans is more sensitive than previously reported. Journal of biological rhythms.;30(4):351-354. doi:10.1177/0748730415585413.
- Vatine G, Vallone Y, Gothilf Y, Foulkes NS (2011) It's time to swim! Zebrafish and the circadian clock. FEBS Lett. 585, 1485–1494. doi.10.1016/j.febslet.2011.04.007
- Vera LM, De Pedro N, Gómez-Milán E, Delgado MJ, Sánchez-Muros MJ, Madrid JA, Sánchez-Vázquez FJ (2007) Feeding entrainment of locomotor activity rhythms, digestive enzymes and neuroendocrine factors in goldfish. Physiol Behav 90, 518–524. doi. 10.1016/j.physbeh.2006.10.017



- Vera LM, Negrini P, Zagatti C, Frigato E, Sánchez-Vázquez FJ, Bertolucci C (2013) Light and feeding entrainment of the molecular circadian clock in a marine teleost (*Sparus aurata*) *Chrono Int* 30-5; 649-661. doi.10.3109/07420528.2013.775143
- Viets K, Eldred KC, Johnston RJ, (2016) Mechanisms of Photoreceptor Patterning in Vertebrates and Invertebrates, *Trends Gen* 32,10,638 – 659. doi. 10.1016/j.tig.2016.07.004
- Villamizar N, García-Alcazar A, Sánchez-Vázquez FJ (2009) Effect of light spectrum and photoperiod on the growth, development and survival of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aqua* 292 80–86. doi. 10.1016/j.aquaculture.2009.03.045
- Villamizar N, Vera LM, Foulkes NS, Sánchez-Vázquez FJ (2014) Effect of Lighting Conditions on Zebrafish Growth and Development. *Zebrafish* 11(2):173-181. doi.10.1089/zeb.2013.0926
- Volkoff H., Hoskins L. J., Tuziak A.M. (2010). Influence of intrinsic signals and environmental cues on the endocrine control of feeding in fish: Potential application in Aquaculture. *Gen. Comp. Endocrinol.* 167, 352–359. doi.10.1016/j.ygcen.2009.09.001
- Volkoff H (2016). The Neuroendocrine Regulation of Food Intake in Fish: A Review of Current Knowledge. *Front. Neurosci.* 10:540. doi. 10.3389/fnins.2016.00540
- Vriend J and Reiter RJ (2015) Melatonin feedback on clock genes: a theory involving the proteasome. *J. Pineal Res.* 58, 1–11. doi. 10.1111/jpi.12189
- Waite R *et al.* (2014). "Improving Productivity and Environmental Performance of Aquaculture." Working Paper, Installment 5 of Creating a Sustainable Food Future. Washington, DC: World Resources Institute. Accessible at <http://www.worldresourcesreport.org>
- Wang M, Zhong Z, Zhong Y, Zhang W, Wang H (2015) The Zebrafish Period2 Protein Positively Regulates the Circadian Clock through Mediation of Retinoic Acid Receptor (RAR)-related Orphan Receptor  $\alpha$  (Ror $\alpha$ ). *J Biol Chem* 290(7):4367-4382. doi.10.1074/jbc.M114.605022
- Wang Y, Pati P, Xu Y, et al.(2016) Endotoxin Disrupts Circadian Rhythms in Macrophages via Reactive Oxygen Species. Cermakian N, ed. *PLoS ONE*. 11(5):e0155075. doi:10.1371/journal.pone.0155075
- Weger BD, Sahinbas M, Otto GW, Mracek P, Armant O, Dolle D, et al. (2011) The Light Responsive Transcriptome of the Zebrafish: Function and Regulation. *PLoS ONE* 6(2): e17080. doi.10.1371/journal.pone.0017080
- Weger BD, Weger M, Görling B, Schink A, Gobet C, Keime C, et al. (2016) Extensive Regulation of Diurnal Transcription and Metabolism by Glucocorticoids. *PLoS Genet* 12(12): e1006512. doi.10.1371/journal.pgen.1006512
- Welsh DK, Takahashi JS, Kay SA (2010) Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 551–577. doi. 10.1146/annurev-physiol-021909-135919
- Wende AR, Young ME, Chatham J, Zhang J, Rajasekaran NS and Darley-Usmar VM (2016) , Redox Biology and the Interface Between Bioenergetics, Autophagy and Circadian Control of Metabolism , *Free Rad Biol and Med.* doi.10.1016/j.freeradbiomed.2016.05.022
- Wilking M, Ndiaye M, Mukhtar H, Ahmad N (2013) Circadian rhythm connections to oxidative stress: implications for human health. *Antioxid Redox Signal* 10;19(2):192-208. doi: 10.1089/ars.2012.4889
- Wu L and Reddy AB (2014) Rethinking the clockwork: redox cycles and non-transcriptional control of circadian rhythms. *Biochem. Soc. Trans* 42 (1) 1-10. doi: 10.1042/BST20130169
- Wu P, Li Y-L, Cheng J, et al. (2016) Daily rhythmicity of clock gene transcript levels in fast and slow muscle fibers from Chinese perch (*Siniperca chuatsi*). *BMC Genomics*, 17:1008. doi:10.1186/s12864-016-3373-z
- Xi Y and Chen D (2014) Partitioning the circadian clock, *Science* 345, 1122. doi. 10.1126/science.1259601
- Yacout SM and Gaillard ER (2017) The Anthocyanins, Oenin and Callistephin, Protect RPE Cells Against Oxidative Stress. *Photochem Photobiol*, 93: 590–599. doi.10.1111/php.12683
- Yadu Y and Shedpure M (2002) Pinealectomy does not modulate the characteristics of 24-h variation in air-gulping activity of *Clarias batrachus*. *Biol. Rhythm. Res.* 33, 141–150. doi.org/10.1076/brhm.33.2.141.1313
- Yang G, Jia Z, Aoyagi T, McClain D, Mortensen RM, Yang T (2012). Systemic PPAR $\gamma$  deletion impairs circadian rhythms of behavior and metabolism. *PLoS ONE* 7:e38117. doi: 10.1371/journal.pone.0038117
- Yaron Z, and Levavi-Sivan B (2011) Endocrine Regulation of Fish Reproduction. In: Farrell A.P., (ed.), *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*, volume 2, pp. 1500–1508. San Diego: Academic Press. doi.10.1016/B978-0-1237-4553-8.00058-7



- Yau K-W and Hardie RC (2009) Phototransduction Motifs and Variations. *Cell* 139(2):246-264. doi. 10.1016/j.cell.2009.09.029
- Yu X, Shao X, Sun H et al. (2008) Activation of cerebral peroxisome proliferator-activated receptors gamma exerts neuroprotection by inhibiting oxidative stress following pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain Research*, 1200, 146–158. doi. 10.1016/j.brainres.2008.01.047
- Yúfera M, Romero MJ, Pujante IM, Astola A, Mancera JM, Sánchez-Vázquez FJ, Moyano FJ, Martínez-Rodríguez G (2014) Effect of feeding frequency on the daily rhythms of acidic digestion in a teleost fish (gilthead seabream). *Chronobiol. Int.* 31, 1024–1033. doi.10.3109/07420528.2014.944265
- Zhang EE & Kay SA (2010) Clocks not winding down: Unravelling circadian networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 764-776
- Zhang F, Vierock J, Yizhar O, et al. (2011) The Microbial Opsin Family of Optogenetic Tools. *Cell*,147(7):1446-1457. doi.10.1016/j.cell.2011.12.004.
- Zhang Z, Wu J, Yu J, Xiao J (2012) A brief review on the evolution of GPCR: conservation and diversification. *Open J Genet*, 2:11–17. doi. 10.4236/ojgen.2012.24B003
- Zhang Z, Jin Z, Zhao Y, Zhang Z, Li, Xiao J, Wu J (2014<sup>a</sup>) Systematic study on G-protein couple receptor prototypes: did they really evolve from prokaryotic genes? *IET Systems Biology*,8(4):154. doi.10.1049/iet-syb.2013.0037
- Zhang R, Lahens NF, Ballance HI, Hughes ME, Hogenesch JB (2014<sup>b</sup>) A circadian gene expression atlas in mammals: Implications for biology and medicine, *PNAS*, 111 (45) 16219-16224. doi.10.1073/pnas.1408886111
- Zhao X, Cho H, Yu RT, Atkins AR, Downes M, Evans RM (2014) Nuclear receptors rock around the clock. *EMBO Reports*. 15(5):518-528. doi.10.1002/embr.201338271
- Zhdanova IV and Reeb SG (2006) Chapter 6. Circadian Rhythms In Fish, in *Book Behaviour and Physiology of Fish: Volume 24* Elsevier Inc. *Fish Physiology*. doi: 10.1016/S1546-5098(05)24006-2



## CAPÍTULO 2. EL EFECTO DEL FOTOPERIODO SOBRE LA DETERMINACIÓN SEXUAL DEL PEZ BLANCO DE PÁTZCUARO *Chirostoma estor*.

### RESUMEN

La determinación sexual en la mayoría de los peces teleósteos es el producto de una mezcla de controles genéticos y respuestas ante señales ambientales. De éstas últimas, la determinación sexual por temperatura (DST) sin duda ha sido la más extensamente estudiada, con poca o nula información acerca de la influencia de otros factores ambientales como el fotoperiodo sobre la determinación sexual. Actualmente los aterinópsidos son aceptados como modelos biológicos para estudiar los mecanismos de determinación sexual en peces. Por lo que el presente trabajo evalúa la influencia de la luz continua sobre la determinación sexual del pez blanco de Pátzcuaro *Chirostoma estor*. El experimento fue realizado en un sistema de recirculación con una temperatura constante de  $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  y dos tratamientos lumínicos: a) Fotoperiodo de luz continua (CL) y b) Fotoperiodo simulado control (CS), al final del estudio (12 semanas post-eclosión) las gónadas (testículos y ovarios) se identificaron histológicamente para obtener las proporciones sexuales en cada tratamiento. En el fotoperiodo de CS se observó un 40% de machos, mientras que en el fotoperiodo de CL se encontró un 73.3% de machos fenotípicos ( $p \leq 0.01$ ). Además en la porción abdominal de larvas ( $n=14$ ) de 5 días post-eclosión se realizaron análisis de expresión relativa por qPCR, en el fotoperiodo de CL el 64.29% de los individuos tuvieron una tendencia de mayor expresión de *sox9* (diferenciación testicular) vs *foxl2* (diferenciación ovárica), mientras que en el fotoperiodo de CS el 35.71% de los individuos presentan esta tendencia relacionada a la diferenciación testicular. En cuerpos completos de larvas ( $n=9$ ) los niveles de expresión de genes asociados al estrés oxidativo (*sod2* y *ucp2*) y la activación del eje de estrés (*gcr1*) no muestran diferencias significativas entre los tratamientos ( $p > 0.05$ ), sin embargo los niveles transcripcionales de enzimas asociadas a la defensa ante el estrés oxidativo (*cat* y *gsr*) y en la activación del eje de estrés como el factor de liberación de corticotropina (*crf*) si presentan diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los tratamientos, observándose una sobreexpresión de estos mRNA en el fotoperiodo de luz continua. En conjunto estas evidencias moleculares e histológicas demuestran que la luz continua aplicada en etapas tempranas de desarrollo puede influenciar la proporciones sexuales en un teleósteo con presencia de DST. Estos resultados son la primer evidencia experimental de masculinización por iluminación continua en una especie de vertebrado e incrementa el conocimiento sobre los mecanismos de determinación sexual ambiental en teleósteos. Sin embargo es necesario realizar una mayor investigación para clarificar la conexión entre el estrés oxidativo y la determinación sexual ambiental que dirige la plasticidad sexual en los vertebrados y especialmente en los peces.



## 2.1. INTRODUCCIÓN

### 2.1.1. Determinación sexual en peces teleósteos

La determinación sexual es el proceso genético o ambiental mediante el cual se establece el sexo del embrión, tras la fertilización. Este proceso en peces puede ser básicamente de dos tipos; Determinación Sexual Genotípica (DSG) y Determinación Sexual Ambiental (DSA). La DSG ocurre cuando el sexo es determinado por la carga genética del individuo sin importar las condiciones ambientales en las que se desarrolle el organismo, por otro lado la DSA ocurre cuando los cambios ambientales determinan el sexo fenotípico del embrión con poca o nula influencia de la carga genética (Devlin y Nagahama, 2002; Penman y Piferrer, 2008).

Entre los vertebrados con DSG se han identificado múltiples genes clave en la determinación sexual, como el SRY/sry (sex-determining region Y) en mamíferos y marsupiales (Sinclair *et al.*, 1990; Foster *et al.*, 1992), *dmrt1* (Double sex y mab3 related transcription factor 1) en el pollo *Gallus gallus domesticus* (Smith *et al.*, 2009) y en el pez plano *Cynoglossus semilaevis* (Chen *et al.*, 2014), el DM-W (Genome-specific DM-domain linked-W) en la rana *Xenopus laevis* (Yoshimoto *et al.*, 2008), el *sox3y* (SRY-Box 3) en el pez medaka hindú *Oryzias dancena* (Takehana *et al.*, 2014) y el *dmrt1bY* en el medaka japonés *Oryzias latipes* (Matsuda *et al.*, 2002; Nanda *et al.*, 2002).

Recientemente se han descubierto otros genes determinantes del sexo en teleósteos que están relacionados estrechamente con la ruta del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), como el gen Y-linked anti-Müllerian hormone (*amhy*) en el atherinópsido *Odontesthes hatcheri* (Hattori *et al.*, 2012) y que también se mantiene conservado en el Cíclido *Oreochromis niloticus* (Li *et al.*, 2015). Otros más son el anti-Müllerian hormone receptor type II (*amhr2*) en el pez globo *Takifugu rubripes* (Kamiya *et al.*, 2012) y el gonadal soma-derived growth factor del cromosoma Y (*GsdfY*) en la medaka filipina *Oryzias luzonensis* (Myosho *et al.*, 2012). También se han reportado genes relacionados con el sistema inmune como el sexually dimorphic on the Y chromosome *sdY-irf9y* en la trucha *Oncorhynchus mykiss* que solo se encuentra en machos y que es determinante del sexo (Yano *et al.*, 2012).

Estas evidencias indican que existe una gran cantidad de genes en diversas especies que han evolucionado independientemente como genes determinantes del sexo. Asociado a esto se ha observado que entre los teleósteos se encuentran diversos sistemas cromosómicos determinantes del sexo (Schultheis *et al.*, 2009; Takehana *et al.*, 2014; Myosho *et al.*, 2015; Pan *et al.*, 2016; Cui *et al.*, 2017). Como ejemplo podemos mencionar a los peces espada *Xiphophorus maculatus*, que poseen diversos cromosomas sexuales (X,Y,W), o los peces Medaka, donde están presentes sistemas cromosómicos XX/XY y ZZ/ZW (Takehana *et al.*, 2007; Takehana *et al.*, 2014, Myosho *et al.*, 2015); o bien los peces espinosos de la familia *Gasterosteidae* donde se ha



observado un sistema cambiante de cromosomas sexuales entre las especies que constituyen esta familia (Ross *et al.*, 2009).

Inclusive en el pez cebra *Danio rerio*, en la lubina *Dicentrarchus labrax* y en el Cíclido *Astatotilapia Burtoni*, se han reportado sistemas de determinación de sexo poligénico; es decir que no existe un sistema de determinación dado por cromosomas sexuales (Vandeputte *et al.*, 2007; Liew *et al.*, 2012; Roberts *et al.*, 2016). Finalmente se ha reportado que el sistema de determinación sexual presenta variaciones entre líneas domesticadas en *D. rerio* (Wilson *et al.*, 2014) por lo que queda de manifiesto que existe una amplia diversidad en los sistemas de determinación genotípica que se han manifestado a lo largo de la evolución en las diferentes especies de peces (Schuppe *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017).

Por otro lado entre los factores ambientales que influyen en la determinación sexual de los teleósteos se encuentran el pH (Rubin, 1985), las interacciones sociales (Godwin, 2009), la temperatura (Conover y Kynard, 1981), el fotoperiodo (Brown *et al.*, 2014) e incluso la tasa de crecimiento (Johnson *et al.*, 2017) pueden influenciar la determinación sexual de las poblaciones.

Entre los factores ambientales, sin duda la determinación sexual por temperatura (DST) ha sido la mas ampliamente estudiada no solo en peces (Valenzuela *et al.*, 2003), si no que también existen reportes en reptiles (Merchant-Larios y Díaz-Hernández 2013), anfibios (Evans *et al.*, 2012; Roco *et al.*, 2015) e incluso en el ave *Aix sponsa*. En esta se observó que las tasas sexuales cambian cuando la incubación se realiza a bajas temperaturas, ya que se incrementa la mortalidad de las hembras, con la consecuente supervivencia de los machos (DuRant *et al.*, 2016).

En el reptil *Pogona vitticeps* las parejas formadas por machos normales (ZZ) y hembras sexualmente revertidas (ZW), producen descendencia homogamética (ZZ) fértil, en la cual el sexo es determinado solo por la temperatura. Esto indica que en solo dos generaciones este reptil pueden cambiar de una determinación sexual genotípica a una determinación sexual por temperatura (Holleley *et al.*, 2015). Conjuntamente transiciones similares han sido propuestas para organismos homogaméticos (XX, ZZ) en peces, anfibios y otros reptiles en un modelo descrito por Schwanz *et al.*, (2013), lo que sugiere que un manejo de las parejas de reproductores incide directamente sobre el tipo de determinación sexual de la progenie.

En peces se ha reportado que existen variaciones en la sensibilidad térmica de los procesos de determinación sexual. Por ejemplo en la mojarra *Lepomis macrochirus* en la que se observan diversos grados de DST entre diferentes familias geográficas (Shen *et al.*, 2016). Incluso entre diferentes familias de reproductores de una misma línea de peces se ha observado que existen diferencias en la sensibilidad térmica, como en *D. rerio* (Ribas *et al.*, 2017) y el aterinópsido *Chirostoma estor*, donde se ha observado que el grado de



presencia de DST varía de acuerdo a la pareja de reproductores (Corona-Herrera *et al.*, 2016).

En *Odontesthes bonariensis*, un atherinópsido sudamericano con una clara presencia de DST, se ha observado que en temperaturas intermedias de incubación los organismos presentan una determinación sexual gobernada por la carga genética (DSG), sin embargo en altas temperaturas se observa 100% de machos y en bajas temperaturas de incubación 100% de hembras (DST). Así que es posible también la coexistencia de ambos sistemas de determinación sexual en una misma especie (Yamamoto *et al.*, 2014).

En conjunto estas evidencias indican una alta plasticidad en la determinación sexual de los peces, lo que hace prácticamente imposible hacer generalizaciones de los sistemas de determinación entre especies o inclusive entre familias de una misma especie, por lo que se deben de realizar estudios particulares para cada población de interés científico o acuícola (Mei y Gui, 2015; Schuppe *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017).

### 2.1.2. Diferenciación sexual en peces teleósteos

La diferenciación sexual es el proceso mediante el cual un conjunto de mecanismos embriológicos, morfológicos fisiológicos, genéticos y moleculares producen un macho o una hembra, a partir de un cigoto de un genotipo específico, en un ambiente dado (Bull, 1983). Aunque se han identificado algunas rutas bioquímicas y moleculares en los mecanismos de diferenciación sexual se ha sugerido la presencia de moduladores endógenos que aún permanecen poco explorados (Devlin y Nagahama, 2002; Strüssmann y Nakamura, 2002; Ospina-Álvarez y Piferrer, 2008; Baroiller *et al.*, 2009; Shoemaker y Crews, 2009; Brown *et al.*, 2014; Roberts *et al.*, 2016; Ribas *et al.*, 2017; Johnson *et al.*, 2017).

Actualmente es ampliamente aceptado que la diferenciación ovárica y testicular a partir de gónadas indiferenciadas, es controlada por hormonas, enzimas, receptores esteroideogénicos y factores de transcripción (Devlin y Nagahama 2002; Nishimura y Tanaka, 2014; Martínez *et al.*, 2014; Tokarz *et al.*, 2015) así como controles epigenéticos (Navarro-Martín *et al.*, 2011; Díaz y Piferrer, 2015; Fan *et al.*, 2017). Que ocurren durante el proceso de diferenciación molecular gonádica (Vizziano *et al.*, 2007), donde la expresión de genes involucrados en el desarrollo ovárico o testicular se incrementa antes de la diferenciación histológica (Shen y Wang, 2014; Pan *et al.*, 2016; Baroiller y D'Cotta, 2016; Liu *et al.*, 2017).

En peces la diferenciación testicular molecular está relacionada con la transcripción de diversos genes entre ellos se encuentran *dmrt1*, *amh*, *cyp11b*, *gsdf*, *fgf9*, *dax1*, *sox3*, *tbx1* y *sox9* (Baron *et al.*, 2005; Vizziano *et al.*, 2007; Yano *et al.*, 2011; Martínez *et al.*, 2014; Pan *et al.*, 2016).



La estructura y función del factor de transcripción SOX9 (Sex Determining Region Y -Box 9) está conservada en mamíferos, aves y peces (Denny *et al.*, 1992; Zhou *et al.*, 2003; Shen y Wang, 2014; Adolfi *et al.*, 2015). En mamíferos la expresión inicial de SOX9 suprime genes relacionados con el desarrollo ovárico, como a WNT4 (Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 4) y  $\beta$ -Catenina (Cadherin-Associated Protein Beta 1) (Nef y Vasalli, 2009). SOX9 también presenta un rol crucial en la diferenciación de las células de Sertoli que brindan soporte estructural y metabólico a las células de Leydig (productoras de testosterona) (Brennan y Capel, 2004) y está asociado con la sobreexpresión de AMH (antimüllerian hormone) (Lasala *et al.*, 2011).

Particularmente en teleósteos la expresión de *amh* y de los factores de transcripción *dmrt1* y *sox9*, se han relacionado con la diferenciación molecular temprana testicular (Rodríguez-Mari *et al.*, 2005; Ijiri *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2010; Nishimura y Tanaka, 2014; Shen y Wang, 2014; Wu *et al.*, 2016; Vizziano-Cantonnet *et al.*, 2016). Recientemente en el pez medaka *Oryzias latipes* se ha demostrado que *dmrt1by* induce la sobreexpresión de *gsdf/sox9a2* y la inhibición de la expresión de *rspo1* lo que promueve la diferenciación testicular (Chakraborty *et al.*, 2016), por lo que el gen *sox9* es un buen indicador de los procesos de diferenciación testicular en peces y puede ser utilizado como marcador molecular masculino (Adolfi *et al.*, 2015; Chakraborty *et al.*, 2016; Vizziano-Cantonnet *et al.*, 2016).

Para el caso de la diferenciación ovárica en teleósteos se ha reportado la sobreexpresión de genes como *fgf*, *rpso4*, *rspo1*, *wnt4*,  $\beta$ -*catenin*, *wnt5*, *sox17*, *sf1*, *hsd17b1*, *fst*, *cyp19a1a* y *foxl2* (Martínez *et al.*, 2014; Vizziano-Cantonnet *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2017). Específicamente los genes *cyp19a1a* (Cytochrome P450 Family 19 Subfamily A Member 1a) y el factor de transcripción *foxl2* (Forkhead Box L2) son expresados en las células de granulosa y teca del folículo ovárico de los teleósteos (Nakamura *et al.*, 2009; Guiguen *et al.*, 2010; Herpin *et al.*, 2013; Fan *et al.*, 2017).

De hecho *foxl2* puede inducir la sobreexpresión de *cyp19a1a*, en las células del folículo y liderar la diferenciación ovárica, por lo que *foxl2* es un buen indicador de la diferenciación gonádica en peces y puede ser utilizado como marcador molecular en hembras (Wang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007; Hattori *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2017). Recientemente se identificó que *foxl2* es un gen maestro en la determinación sexual presente en las hembras de la cabra (*Capra aegagrus hircus*), lo que ratifica su función ligada al desarrollo ovárico a través de la evolución en vertebrados (Boulanger *et al.*, 2014).

De manera interesante se ha demostrado que *foxl2* inhibe por diversos mecanismos moleculares a *sox9* para mantener la identidad de las células de granulosa en mamíferos (Georges *et al.*, 2014) y peces (Casas *et al.*, 2016), lo que sugiere que estos genes presentan funciones antagónicas muy estrechas



en el proceso de diferenciación y mantenimiento de la identidad sexual de la gónada (Elzaiat *et al.*, 2017).

Específicamente, para los atherinópsidos *Odontesthes sp.* se han identificado los genes *dmrt1*, *amh*, *sox9*, *nr5a1*, *cyp11a1* y *cyp11b* en el proceso de diferenciación testicular (Fernandino *et al.*, 2008; Blasco *et al.*, 2010), mientras que *cyp19a1a* y *foxl2* se expresan en procesos de diferenciación ovárica (Karube *et al.*, 2007; Fernandino *et al.*, 2008; Hattori *et al.*, 2012). Es por esta razón que para *Chirostoma estor* en el presente estudio se seleccionaron los genes *sox9* y *foxl2* como indicadores de diferenciación gonádica molecular.

Estas observaciones indican que en los atherinópsidos la expresión de estos genes se ha conservado y pueden utilizarse como indicadores para realizar estudios moleculares. Aunado a que en los últimos años algunos miembros de la familia Atherinopsidae se han convertido en modelos biológicos para estudiar los mecanismos de determinación y diferenciación sexual, debido a su sensibilidad ante los factores ambientales (Strüssmann *et al.*, 2010; Hattori *et al.*, 2012; Yamamoto *et al.*, 2014; Brown *et al.*, 2014; Corona-Herrera *et al.*, 2016).

### 2.1.3. Influencia del fotoperiodo en la determinación sexual de animales acuáticos

El manejo del fotoperiodo y la aplicación de regímenes de luz continua es una práctica común en los sistemas de producción acuícola para mejorar el crecimiento somático y modular la reproducción de los peces en estadios juveniles (Endal *et al.*, 2000; Hansen *et al.*, 2001; Begtashi *et al.*, 2004; Nagasawa *et al.*, 2012; Melo *et al.*, 2014; Ammar *et al.*, 2015; Martins *et al.*, 2015); sin embargo existe poca información a cerca de los efectos de la luz continua y las diferentes longitudes de onda en estadios tempranos de desarrollo (Di Rosa *et al.*, 2015).

Recientemente en un atherinópsido con presencia de DST *Leuresthes tenuis*, se reporta que tratamientos de temperaturas bajas producen una mayor proporción de hembras, de la misma manera cuando los embriones se someten a un fotoperiodo de 15 horas luz / 9 oscuridad (15L:9D) se observa el mismo fenómeno en las proporciones sexuales (Brown *et al.*, 2014). Este reporte en una especie con presencia de DST, es el primer reporte de una determinación sexual por fotoperiodo (DSP) en vertebrados.

Sin embargo en invertebrados acuáticos se ha reportado la influencia del fotoperiodo sobre la determinación sexual desde hace un par de décadas. Tal es el caso del balanus *Heterosaccus lunatus* (Walker, 2005), así como los anfípodos *Gammarus duebenni* y *Equinogammarus marinus* (Naylor *et al.*, 1988<sup>a,b</sup>; Guler *et al.*, 2012) donde la exposición a un fotoperiodo de 16L: 8D produce poblaciones con una mayor proporción de machos.



En la pulga de agua *Daphnia magna* se observa que los días cortos pueden producir una mayor cantidad de organismos masculinizados en las poblaciones (Hobaek y Larsson, 1990), mientras que en el isópodo *Asellus aquaticus* las proporciones sexuales dependen de la herencia materna con poca influencia del fotoperiodo (Vitagliano *et al.*, 1996). Finalmente en el insecto *Acyrtosiphon pisum* una fase oscura de 10.5-11 horas produce una mayor cantidad de machos (Lees, 1990). A pesar de estos reportes actualmente no se han identificado cuales son los mecanismos biológicos entre la percepción lumínica y la determinación sexual ambiental en animales acuáticos.

En conjunto estas evidencias indican que la diversidad en la determinación sexual ambiental en animales y especialmente en vertebrados, no está bien comprendida, por lo que se requiere de un mayor esfuerzo en investigación para entender como los organismos sensan las señales ambientales y estas a su vez lideran los mecanismos para la determinación sexual en vertebrados.

#### **2.1.4. Determinación/diferenciación sexual, estrés y estrés oxidativo en peces**

El sistema de defensa antioxidante en vertebrados e invertebrados se encuentra altamente conservado. Por otro lado las señales ambientales (temperatura, salinidad, oxígeno, disponibilidad de alimento y fotoperiodo) modulan múltiples funciones metabólicas, actividades fisiológicas y especialmente los mecanismos bioquímicos frente a las especies reactivas de oxígeno (ROS), para poder lidiar con los cambios ambientales y sobrevivir. Sin embargo estas características han recibido poca atención en estudios comparativos (Monaghan *et al.*, 2009; Chainy *et al.*, 2016).

En los últimos años algunos trabajos han demostrado que la exposición a variaciones ambientales como la temperatura (Lushchak *et al.*, 2011; Vinagre *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2017), la disponibilidad de oxígeno (Lushchak *et al.*, 2011; Olsvik *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2017), la salinidad (Yin *et al.*, 2011; Lushchak *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2017), el pH (Mai *et al.*, 2010; Tiedke *et al.*, 2013; Carvalho *et al.*, 2015; Ramírez-Duarte *et al.*, 2016), el amonio (Sinha *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2014; Cheng *et al.*, 2015; Jin *et al.*, 2017), así como la cantidad y/o calidad de luz (Choi *et al.*, 2012; Giannetto *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2014; Purushothaman *et al.*, 2015; Tian *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2016; Choi *et al.*, 2016; Yuan *et al.*, 2017; Ramírez-Duarte *et al.*, 2017) generan cambios en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y en la respuesta ante el estrés oxidativo (Chainy *et al.*, 2016), además de generar procesos apoptóticos e incremento de cortisol en los peces (AnvariFar *et al.*, 2017).

Desde el punto de vista de la biología evolutiva, se ha encontrado que existen correlaciones entre el estrés oxidativo y la modulación de las características sexuales secundarias (ornamentación o coloración), lo que permite la elección de la pareja más saludable para reproducirse y asegurar la sobrevivencia de la



progenie (Von Schantz *et al.*, 1999). Esta idea planteada hace más de una década y que vincula características sexuales con estrés oxidativo ha generado más de 300 artículos científicos que han demostrado su validez en aves y en peces (Garratt y Brooks *et al.*, 2012).

Además ideas recientes relacionan la química redox en el contexto de la teoría de la historia de vida. La teoría básicamente propone que los organismos pueden dirigir la inversión de la energía entre la reproducción, el crecimiento y la supervivencia. Donde el estrés oxidativo puede ser un mediador clave en estos procesos fisiológicos (Metcalf y Alonso-Alvarez, 2010; Speakman *et al.*, 2015).

Como se mencionó en párrafos anteriores, los factores ambientales pueden inducir cambios en la tasa de proporción sexual, lo que abre la pregunta de si podría existir un vínculo entre el estrés oxidativo, generado por los cambios ambientales y la determinación/diferenciación sexual en peces. Recientemente en los espermatozoides humanos se ha relacionado la carga cromosómica X o Y con la respuesta ante el estrés oxidativo. En los espermatozoides Y (que contienen el gen SRY) se observa una mayor sensibilidad ante las condiciones oxidantes con una consecuente muerte apoptótica (You *et al.*, 2017).

En el gusano *Caenorhabditis elegans* otro gen maestro de determinación sexual (Dmrt1), solo presenta en machos, se ha relacionado con la hipersensibilidad ante factores de estrés oxidativo (Inoue y Nishida, 2010). En el pez cebra *D. rerio*, un trabajo reciente muestra que los machos son más susceptibles que las hembras al estrés oxidativo ocasionado por la exposición a mercurio inorgánico, lo que origina un daño gonádico, cambios en los niveles hormonales y disrupción de la transcripción génica del eje de reproducción (Zhang *et al.*, 2016).

Otros trabajos recientes en mamíferos reportan que existe un vínculo entre las condiciones de estrés oxidativo y los genes relacionados con la ruta TGF- $\beta$  (Liu y Desai *et al.*, 2015; Krstic *et al.*, 2015) como el gen AMH (Ma *et al.*, 2014; Saleh y Mansour, 2016; Ma *et al.*, 2016) y el gen relativo al sistema inmune IRF9 (Zhang *et al.*, 2016). Estas evidencias en mamíferos sugieren que podría existir un vínculo entre estos genes maestros de determinación sexual en peces y las condiciones de estrés oxidativo celular ante los cambios ambientales.

Por otro lado, la exposición a esteroides androgénicos (17 $\alpha$ -metiltestosterona), utilizados para procesos masculinizar las poblaciones de peces de acuicultura. Generan un incremento del estrés oxidativo, el cual modula la expresión de genes y la actividad de enzimas antioxidantes en el desarrollo temprano de la tilapia (Zheng *et al.*, 2016). Además se ha observado que la presencia de otras sustancias androgénicas como la Testosterona, la 11-Ketosterona (11KT), la 17 $\alpha$ -metildihidrotestosterona y la 17 $\beta$ -trenbolona también incrementan las respuestas al estrés oxidativo en teleósteos, aún en bajas concentraciones



(Martyniuk y Denslow, 2012). Incluso en mamíferos y aves se ha relacionado la presencia de testosterona con el aumento del estrés oxidativo lo que sugiere que este vínculo podría ser conservado en vertebrados (Alonso-Alvarez *et al.*, 2007; Metcalfe y Alonso-Alvarez, 2010; Garratt y Brooks *et al.*, 2012).

Los factores feminizantes estrogénicos (Estradiol,  $17\beta$ -estradiol y  $17\alpha$ -etinilestradiol) también pueden generar cambios en las proporciones sexuales e incluso reversión sexual en los peces (Aris *et al.*, 2014). En la lubina *Micropterus salmoides* altas concentraciones de  $17\alpha$ -etinilestradiol generan un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno y la activación de los mecanismos antioxidantes celulares en el hígado (Colli-Dula *et al.*, 2014).

En la trucha arenera *Micropogonias undulatus* un tratamiento con  $17\beta$ -estradiol reduce la producción del anión superóxido en el cerebro de peces expuestos a condiciones de hipoxia (Rahman y Thomas, 2015). En la lubina japonesa *Lateolabrax japonicus* se reporta que niveles subletales de estrógenos ejercen un impacto sobre la capacidad inmune, el estrés oxidativo y las respuestas antioxidantes, las cuales son dependientes de la dosis administrada (Thilagam *et al.*, 2010; Thilagam *et al.*, 2014), mientras que en el pez cebrá *D. rerio*, el  $17\alpha$ -etinilestradiol inhibe la apoptosis en la gónada y permite el desarrollo ovárico normal (Luzio *et al.*, 2016).

En las células de granulosa de mamíferos se ha demostrado que el gen de diferenciación ovárica FOXL2, regula positivamente mecanismos relacionados con la detoxificación de ROS y reparación de daños del DNA ante señales de estrés oxidativo (Benayoun *et al.*, 2009; Benayoun *et al.*, 2011) lo que sugiere que podría existir un vínculo entre el estrés oxidativo y la diferenciación ovárica en vertebrados.

Por otro lado en el atherinópsido *O. bonariensis* (especie con Determinación Sexual por Temperatura) se observó que la administración de dexametasona (Glucocorticoide sintético, relacionado con la respuesta a estrés), durante el periodo de diferenciación sexual induce una población 100% masculinizada. Este resultado sugiere que el eje de estrés lidera el proceso y que la temperatura es solo el factor estresante (Hattori *et al.*, 2009). Resultados similares se han reportado en el lenguado *Paralichthys olivaceus* (Yamaguchi *et al.*, 2010; Yamaguchi y Kitano, 2012), en hembras genéticas de Medaka (Hayashi *et al.*, 2010) y durante el cambio de sexo por interacción social en el pez payaso *Amphiprion ocellaris* (Iwata *et al.*, 2012).

En *O. bonariensis*, durante la fase de diferenciación sexual, se ha encontrado un aumento en la expresión de la enzima  $11\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (*11 $\beta$ hsd2*) que es la encargada de convertir el glucocorticoide cortisol en cortisona y sintetiza el 11-KT, el andrógeno más potente en peces (Fernandino *et al.*, 2012; Fernandino *et al.*, 2013; Castañeda *et al.*, 2014). En el bagre *Clarias batrachus*, la expresión de *11 $\beta$ hsd* está regulada por el factor de



transcripción relacionado con el desarrollo testicular *sox3* (Rajakumar y Senthilkumaran, 2016) y que en la Medaka *Oryzias dancena* existe una copia (*sox3y*) que funciona como gen maestro de determinación sexual (Takehana *et al.*, 2014). En el medaka japonés *O. latipes* se observó una expresión diferencial mayor en hembras del receptor de glucocorticoides *gcr1* (Kikuchi *et al.*, 2015). En conjunto estos datos sugieren niveles de expresión dimórfica de *sox3*, *gcr1* y *11βhsd2*, así como un vínculo entre el eje de estrés y los mecanismos de diferenciación sexual (Hattori *et al.*, 2009; Castañeda *et al.*, 2014).

El metabolismo normal y la exposición a xenobióticos produce las ROS que actúan como mensajeros redox en las señales intracelulares, sin embargo cuando existe un exceso de ROS, se induce una modificación oxidativa de las moléculas, inhibe las funciones de las proteínas y promueve procesos apoptóticos celulares (Circu y Aw, 2010).

En *O. bonariensis*, se observa la sobreexpresión del mRNA de *amh*, la inhibición del *cyp19a1a* y condiciones de apoptosis en células somáticas de la gónada masculina, por lo que la presencia de cortisol puede estar relacionada con la apoptosis y el desarrollo normal del testículo (Hattori *et al.*, 2009; Yamamoto *et al.*, 2013), además en pez cebrá *D. rerio*, también se ha relacionado la presencia de la apoptosis en células germinales primordiales con la diferenciación testicular (Tzung *et al.*, 2015) y durante el proceso de reversión sexual de hembras a machos (Rodríguez-Marí *et al.*, 2010).

En conjunto estas observaciones de la influencia de los cambios ambientales, la exposición a factores esteroideos (masculinizantes, feminizantes y cortisol), la sensibilidad de los genes determinantes del sexo y las condiciones pro/anti-apoptóticas. Aportan evidencias de la existencia de un vínculo entre los procesos de estrés oxidativo y los genes/mecanismos involucrados en la determinación/diferenciación sexual que aún no se ha dilucidado completamente en peces y vertebrados.

En aras de abonar a este conocimiento, en el presente estudio se explora si un fotoperiodo de luz continua puede influenciar la determinación sexual en el atherinópsido *Chirostoma estor*, así como la probable participación de la maquinaria de respuesta ante la presencia de especies reactivas de oxígeno y la activación del eje de estrés.

### **2.1.5. Relaciones entre el eje de estrés y el estrés oxidativo en peces**

En vertebrados existen diversos trabajos que relacionan a los glucocorticoides con la modulación del estrés oxidativo (Costantini *et al.*, 2011; Sopinka *et al.*, 2015). En el cerebro de mamíferos se ha demostrado que las neuronas sensan, transmiten y convierten las señales de ROS en respuestas intracelulares que modulan las funciones sinápticas (Drougard *et al.*, 2015).



La presencia de ROS puede activar las neuronas de Pro-Opiomelanocortina POMC (Andrews *et al.*, 2008; Drougard *et al.*, 2015), las cuales producen la proteína precursora POMC, que contiene 3 péptidos principales la  $\gamma$ -Hormona estimulante de melanocitos ( $\gamma$ -MSH), la  $\beta$ -lipotropina y la Adrenocorticotropina ACTH (Alsop y Vijayan, 2009; Villamizar *et al.*, 2014; Gallo-Payet, 2016). La ACTH es la hormona que actúa en la corteza adrenal (mamíferos) o células interrenales (peces) y estimula la producción de glucocorticoides a través de la acción enzimática de 11- $\beta$  hidroxilasa (*cyp11b1*) que convierte el 11-deoxicortisol en cortisol y es considerada la principal hormona de estrés que actúa principalmente sobre el receptor de glucocorticoides *gcr1* de vertebrados (Lupien *et al.*, 2007, Cruz *et al.*, 2013; Gallo-Payet, 2016).

El cortisol actúa en los tejidos mediante la unión a los receptores de nucleares de glucocorticoides (GRs). Los GRs regulan la transcripción génica por medio de la unión a elementos de respuesta a glucocorticoides (GREs) localizados en la región promotora de los genes diana. De esta manera el cortisol modula el crecimiento, la reproducción, el balance energético, la osmoregulación, la respuesta inmune, entre otras (Bury y Sturm, 2007; Alsop y Vijayan, 2009; Tsalafouta *et al.*, 2014).

Durante la ontogenia temprana en peces se ha descrito que los genes del eje de estrés comienzan su expresión transcripcional durante las primeras horas después de la fertilización, sin embargo, la producción de cortisol y las primeras respuestas fisiológicas al estrés se observan hasta después de la eclosión (Chandrasekar *et al.*, 2007; Alderman y Bernier, 2009; Alsop y Vijayan, 2009; Fuzzen *et al.*, 2011; Tsalafouta *et al.*, 2014). También se ha demostrado que durante la fase larvaria de pez cebra *D. rerio*, la presencia de glucocorticoides incide en la respuesta ante el estrés oxidativo (Chen *et al.*, 2017).

En juveniles de trucha café (*Salmo trutta*) la administración de cortisol exógeno incrementa la producción del antioxidante glutatión y sugiere que el cortisol puede coadyuvar para contrarrestar la producción de ROS (Birnie-Gauvin *et al.*, 2017). Dichas evidencias sugieren un vínculo entre el eje de estrés Hipotálamo-Hipófisis-Adrenales/Interrenales (HPA/I) y el estrés oxidativo, sin embargo las relaciones entre estos elementos necesitan ser clarificadas (Schiafone *et al.*, 2013; Nardocci *et al.*, 2014).

Uno de los actores que pueden tener una acción en ambos sistemas son las proteínas desacoplantes (UCPs). Estas son proteínas de la membrana interna mitocondrial que disipan el gradiente de protones, reducen la eficiencia en la producción de ATP, regulan la termogénesis y controlan la producción de ROS (Ledesma *et al.*, 2002; Krauss *et al.*, 2005). En las neuronas POMC de mamíferos se ha observado que la sobreexpresión de UCP2 disminuye la actividad de la cadena transportadora de electrones (CTE) y la consecuente producción de ROS (Voza *et al.*, 2014).



La disminución de ROS silencia las neuronas POMC y probablemente inhibe la activación del eje de estrés en el hipotálamo (Drougard *et al.*, 2015). En mamíferos UCP2 se ha relacionado con el control de la alimentación, crecimiento, modulación del sistema inmune, balance energético, metabolismo de lípidos y glucosa (Emre y Nübel, 2010; Toda y Diano, 2014). Recientemente en ratones se ha reportado un vínculo entre la activación del eje de estrés, la liberación de glucocorticoides con la sobreexpresión de UCP2. Esto lidera la resistencia ante factores que inducen la muerte celular, por lo que también UCP2 podría estar involucrada en procesos de regulación de apoptosis (Kasahara *et al.*, 2015).

En peces se ha observado la expresión de hasta cuatro isoformas de Ucp2 en diversos tejidos de la carpa *Cyprinus carpio* (Stuart *et al.*, 1999), la anguila antártica *Pachycara brachycephalum*, el blenio *Zoarces viviparus* (Mark *et al.*, 2006), la lubina *Dicentrarchus labrax* (Tine *et al.*, 2012), el mero *Epinephelus coioides* (Tang *et al.*, 2013), la dorada (Bermejo-Nogales *et al.*, 2010; Vera *et al.*, 2014; Bermejo-Nogales *et al.*, 2014), pez cebra *D. rerio* (Zheng *et al.*, 2015) y la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* (Craig *et al.*, 2013; Librán-Pérez *et al.*, 2013; Otero-Rodiño *et al.*, 2015). Estas evidencias indican que las Ucp2 han sido conservadas entre los teleosteos. Se ha sugerido que el monitoreo de su expresión, es indicativo del estado de estrés y estrés oxidativo mitocondrial ante factores ambientales en peces (Bermejo-Nogales *et al.*, 2014; Vera *et al.*, 2014).

Otras enzimas que están relacionadas con la actividad antioxidante, son la glutatión reductasa (Gsr), la catalasa (*Cat*) y las superóxido-reductasas (*Sod1* y *Sod2*), las cuales en conjunto son consideradas la primera línea de defensa en condiciones de estrés oxidativo en peces (Yuan *et al.*, 2017). Estas enzimas se activan cuando dos moléculas del anión superóxido  $O_2^{\cdot -}$  producido en la CTE mitocondrial, son óxido-reducidas por la enzima *Sod2* en  $O_2$  y  $H_2O_2$ . Posteriormente 2 moléculas de  $H_2O_2$  son transformadas en  $H_2O$  y  $O_2$  por la acción de la glutatión peroxidasa (Gpx), que utiliza el antioxidante no enzimático glutatión-reducido (GSH) en la mitocondria (Pacitti *et al.*, 2013). Así como la acción de la enzima *Cat* en los Peroxisomas (Lismont *et al.*, 2017). La *Gsr*, se encarga de reducir el glutatión para mantener el glutatión-reducido (GSH) en las mitocondrias a partir del uso de  $NADPH+H^+$  (Montserrat *et al.*, 2011).

Por otro lado como se ha explicado ampliamente en el primer capítulo, la luz visible incrementa la producción de ROS y afecta las funciones fisiológicas de los organismos (Lascaratós *et al.*, 2007), además estudios recientes demuestran que el sistema antioxidante redox ha evolucionado en conjunto con otras características biológicas como los ritmos circadianos, lo que pone de manifiesto la importancia de las ROS como señales intracelulares ante cambios lumínicos (Edgar *et al.*, 2012; Ray y Reddy, 2016).

Específicamente, la expresión de las enzimas antioxidantes relacionadas al estrés oxidativo por cambios en las variables lumínicas, se han observado en el



pez payaso *Amphiprion melanopus* (Choi *et al.*, 2012), en el pez dorado *Carassius auratus* (Kim *et al.*, 2014); en la brema *Megalobrama amblycephala* (Tian *et al.*, 2015); en la brema rayada *Oplegnathus fasciatus* (Choi *et al.*, 2016), en el lenguado *Paralichthys olivaceus* (Kim *et al.*, 2016); en el pez cebra *D. rerio* (Yuan *et al.*, 2017) y en el medaka japonés *O. latipes* (Ramírez-Duarte *et al.*, 2017). Sin embargo existen pocos reportes donde se estudien los efectos de la iluminación continua sobre la producción de ROS, las enzimas antioxidantes (Giannetto *et al.*, 2014; Purushothaman *et al.*, 2015) y la producción de cortisol en peces (Cowan *et al.*, 2017).

En experimentos con ratas privadas de sueño, se demostró que la capacidad antioxidante cerebral se encuentra disminuida sustancialmente (Everson *et al.*, 2005), disminuyen los niveles de glutatión (D'almeida, 1998) y la actividad de SOD es minimizada en el hipocampo y en el tallo cerebral (Ramanathan, 2002), además se ve incrementada la producción del factor liberador de corticotropina (CRF) y corticosterona que activan el eje de estrés en los roedores (Schivavone *et al.* 2013). En peces la producción de cortisol sin influencia de factores estresantes, se ha descrito en algunas especies y se observan picos de producción en la fase nocturna o diurna que dependen del comportamiento de cada especie analizada (Cowan *et al.*, 2017).

Sin embargo cuando las condiciones de iluminación son constantes (iluminación continua) en la tilapia *Oreochromis niloticus* (Biswas *et al.*, 2004), la brema *Pagrus major* (Biswas *et al.*, 2006), la brema rayada *Oplegnathus fasciatus* (Biswas *et al.*, 2008), la dorada *Sparus aurata* (López-Olmeda *et al.*, 2009), el salmón (Huang *et al.*, 2010), el lenguado *Solea senegalensis* (Oliveira *et al.*, 2013), la trucha *Oncorhynchus mykiss* (Hernández-Pérez *et al.*, 2015) y la perca *Perca fluviatilis* (Brüning *et al.*, 2015) no se encuentran diferencias significativas en los niveles de cortisol entre tratamientos, esto sugiere que la luz continua puede afectar los ritmos circadianos pero presenta poca influencia sobre las condiciones de estrés.

En el bacalao del atlántico *Gadus morhua*, la iluminación continua incrementa la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo, como la superóxido-reductasa (*sod2*), la catalasa (*cat*) y la glutatión reductasa (*gsr*). Estas respuestas podrían estar relacionadas con la disminución de la síntesis de melatonina debido a las condiciones continuas de iluminación (Giannetto *et al.*, 2014), ya que la melatonina tiene una potente acción antioxidante, reduce la formación de ROS e inhibe procesos apoptóticos (Hardeland *et al.*, 2003; Herrera *et al.*, 2007; Cruz *et al.*, 2014; Maitra y Hasan, 2016).

De manera similar en el pez cebra *D. rerio*, bajo 5 días de iluminación continua se observó que existe una mayor expresión de proteínas relacionadas con el estrés oxidativo como *sod1*, peroxiredoxina 2 y 5 (*prx2*, *prx5*), así como proteínas receptoras de células T (TCR- $\alpha$ ) involucradas en procesos del sistema inmune de la mucosa (Purushothaman *et al.*, 2015), que también



responden directamente a variaciones de ROS (Kesarwani *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016).

En el pez blanco de Pátzcuaro *Chirostoma estor* experimentos con luz continua indican que existe un incremento en el crecimiento de 43%, con un consecuente retraso en el inicio de la madurez sexual (Martínez-Chávez *et al.*, 2014). Además de una mejora en el desempeño reproductivo con el uso de fotoperiodos largos (Martínez-Palacios *et al.*, 2007). Para conocer si existe una influencia de la luz continua sobre la determinación sexual, el eje de estrés y el estrés oxidativo en *C. estor*, el presente estudio reporta las tasas de proporción sexual (por observación histológica de la gónada) y la expresión transcripcional de los genes relacionados con: a) la diferenciación sexual molecular (*foxl2*, *sox9*); b) la activación del eje de estrés (*crf*, *gcr1*) y la respuesta al estrés oxidativo (*ucp2*, *sod2*, *cat* y *gsr*).

## 2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1. Condiciones experimentales

El sistema experimental consistió de seis tanques (3 por cada condición experimental) con una capacidad de 90 litros cada uno, un sistema de filtración mecánica y biológica con una salinidad de 5 g·l<sup>-1</sup> (Martínez-Palacios *et al.*, 2004). El flujo de agua de los tanques fue de 1.3 l·m<sup>-1</sup>, el oxígeno fue mantenido a 5.5±0.5 g·l<sup>-1</sup>, el pH en 7.5 y la temperatura se ajustó a 20 ± 1°C con un sistema automático (LN-5800, BOYU).

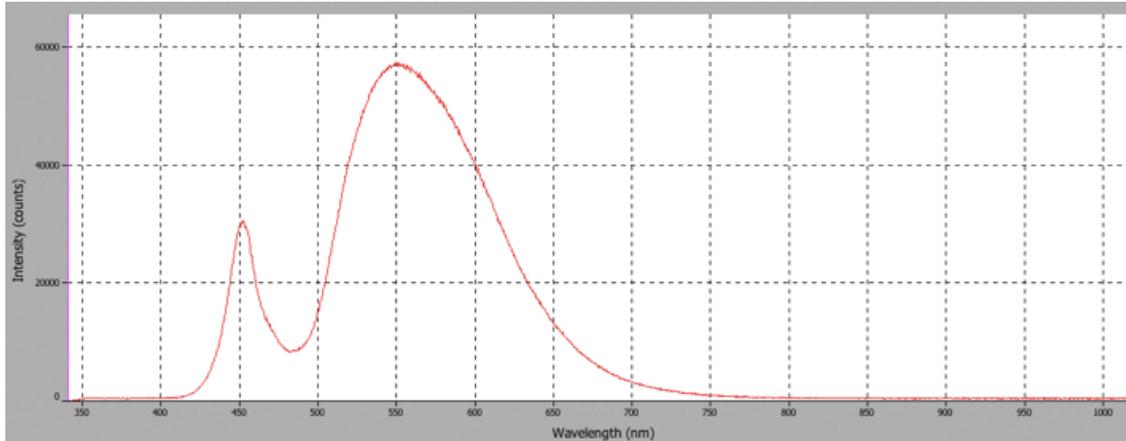
Durante toda la serie experimental la salinidad fue evaluada con un refractómetro (S/Mill-E 0-100 g l<sup>-1</sup>, ATAGO), la temperatura fue monitoreada con un termómetro de mercurio (-20°C to 110°C). El pH, el amonio total (NH<sub>3</sub>-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) y los niveles de Nitritos (NO<sub>2</sub>) fueron evaluados con un test colorimétrico (FF-3, HACH). Los niveles de oxígeno disuelto fueron monitoreados con un oxímetro (51B, YSI), la intensidad lumínica fue monitoreada con un luxómetro digital (YK-10LX Lutron) y el espectro de la luz LED, con un espectrómetro (USB2000+VIS-NIR Ocean Optics Spectrometer).

Los tratamientos fotoperiódicos a) 12 Luz: 12 Oscuridad, Fotoperiodo simulado control (CS) y b) 24 Luz: 0 Oscuridad, Fotoperiodo de luz continua (CL); Fueron controlados con un sistema automático (RadioRA2 LUTRON). La iluminación se proporcionó con una intensidad de 26.14 watts·m<sup>2</sup>, con lámparas T8-LED, de luz fría de 6500 K con amplio espectro (Figura 8). En el experimento se obtuvieron alrededor de 2,250 huevos fertilizados provenientes de 6 parejas de reproductores de *C. estor*. Los huevos de todas las parejas fueron mezclados, para posteriormente dividirlos en 3 réplicas por cada tratamiento lumínico, hasta cumplir 12 semanas post-eclosión (SPE) (Figura 1).

Una vez eclosionadas, las larvas de *C. estor* fueron alimentadas con rotífero *Brachionus plicatilis* y nauplio de *Artemia sp.*, como se ha descrito en Martínez-



Palacios *et al.*, (2006). A las 4 SPE, el alimento vivo se complementó con una dieta específica para aterinópsidos (con un 43% de proteína). Es importante mencionar que durante toda la fase experimental, la alimentación fue proporcionada 24 horas al día, con el apoyo de alimentadores automáticos Boyu (ZW-82).



**Figura 8.** Espectro de tubos T8-LED, luz fría (6500K) obtenida con el espectrómetro USB2000+VIS-NIR Ocean Optics Spectrometer.

### 2.2.2. Análisis histológico de las gónadas y descripción fenotípica del sexo

Para determinar el desarrollo gonádico y el sexo fenotípico se realizó un análisis histológico de la gónada en 15 juveniles al azar, por cada réplica experimental (n=45 por tratamiento), a las 12 SPE. Para esto, los peces fueron sedados en agua helada, sacrificados y colocados en una solución de fijación histológica Bouin (HT10132, SIGMA), durante 24 horas. Posteriormente fueron procesados por la técnica de histología clásica Hematoxilina-Eosina-Floxina.

Las laminillas de los cortes histológicos se observaron con microscopía de campo claro. El criterio para determinar el sexo fenotípico fue el siguiente: a) hembras: Ovarios con presencia de cavidad ovárica, ovogonias, ovocitos en fase de diploteno y perinucleolares; b) Machos: Testículos con presencia de espermatogonias, células somáticas en el interior de la gónada, ducto espermático y vasos capilares. Todos estos criterios han sido establecidos en trabajos anteriores descritos (Corona-Herrera *et al.*, 2016).

### 2.2.3. Cuantificación relativa por qPCR en tiempo real

Para realizar los análisis moleculares, se obtuvieron 23 larvas al azar de 5 días post-eclosión (DPE), por cada tratamiento, durante la fase luminosa. Las larvas fueron sedadas con agua helada y transferidas inmediatamente a una solución de RNA later (Thermo Scientific). Se mantuvieron durante 24 horas a 4°C y después se almacenaron a -80°C, hasta la fase de extracción de RNA.



Las extracciones de RNA se realizaron con el kit comercial Gene jet RNA purification kit (Thermo Scientific). Se seleccionaron 14 secciones abdominales de larvas para efectuar la extracción de RNA y llevar a cabo los análisis de expresión de los genes objetivo, relacionados con la diferenciación sexual molecular (*sox9*, *foxl2*).

Además se efectuó la extracción de RNA de 9 larvas completas, para realizar el análisis de expresión de los genes objetivo, relacionados con el eje de estrés (*crf*, *gcr1*) y con la respuesta al estrés oxidativo (*ucp2*, *sod2*, *cat*, *gsr*). Como genes de referencia se evaluaron el gen de la Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (*gapdh*), el gen de la Proteína ribosomal 60s L5 (*rpl5*) y el gen del Factor de elongación 1 alfa (*ef-1 $\alpha$* ).

Las concentraciones del RNA de cada muestra se determinaron con la absorbancia a 260nm y la pureza con la tasa de absorción a 260nm/280 nm mediante el uso del micro-espectrofotómetro NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific). Posteriormente se realizaron tratamientos para eliminar el DNA con el protocolo de DNaseI, RNase-free (Thermo Scientific).

La integridad del RNA de cada muestra fue evaluada por electroforesis no desnaturizante en un gel de agarosa (A9539, SIGMA) al 1.5%, teñido con GelRed Nucleic Acid Gel Stain (BIOTIUM).

Después de verificar la calidad del RNA total, se utilizaron 100ng de cada muestra para la síntesis cDNA, de acuerdo al protocolo del First strand cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific). Con la inclusión de controles negativos de transcriptasa reversa y blancos sin contenido de RNA.

La cuantificación de los transcritos se llevó a cabo con el uso de un sistema de qPCR en tiempo real StepOnePlus (Thermo Scientific), con el protocolo de la Maxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (Thermo Scientific) y mediante el uso de oligonucleótidos específicos para cada gen (Tabla 1), diseñados con ayuda del software IDT primer quest software ([www.idtdna.com/Primerquest](http://www.idtdna.com/Primerquest)).

Las reacciones de amplificación fueron realizadas por triplicado, en un volumen final de 12.5ul, que contenía: 250 ng de cDNA, 0.20  $\mu$ M de cada oligonucleótido, y 6.25 ul de SYBR Green/Rox, como control negativo se incluyeron 3 reacciones sin muestra de cDNA.

La amplificación se realizó con el termociclador StepOnePlus, con una desnaturalización inicial de 95°C durante 10 min, seguida de 40 ciclos de 15s a 95°C, 15s a la temperatura de hibridación de cada par de oligonucleótidos (Tabla 1) y una extensión final de 15 s a 72°C.

Después de la fase de amplificación se realizó un análisis derivativo de la curva de desnaturalización (melting), con incrementos de 0.5°C de 60 a 95°C para



confirmar la amplificación de un solo producto, en cada muestra analizada (Figura 9).

Las curvas estándar se conformaron de 5 puntos de dilución y fueron utilizadas para calcular la eficiencia de amplificación en las reacciones de qPCR. Los porcentajes de eficiencia pueden observarse en la Tabla 1.

Los valores del ciclo umbral (Ct), la concentración del gen de referencia y el gen objetivo fueron calculados con ayuda del software StepOnePlus v2.2.2 (Thermo Scientific), bajo el método de curva estándar.

Cabe mencionar que el cDNA para las curvas estándar entre placas y genes fue el mismo para todas las condiciones (cDNA de la porción abdominal para los genes *ef-1 $\alpha$* , *sox9*, *foxl2* y cDNA de cuerpo completo para *ef-1 $\alpha$* , *crf*, *gcr1*, *ucp2*, *sod2*, *cat* y *gsr*), para evitar variaciones en las concentraciones y la preparación de las curvas estándar correspondientes.

Para realizar la cuantificación relativa de la expresión se utilizó como gen de referencia el gen *ef-1 $\alpha$*  de acuerdo al análisis de estabilidad de genes de referencia realizado para este experimento con ayuda del software RefFinder (Xie *et al.*, 2012) (Figura 10).

**Tabla 1.** Secuencias, porcentajes de eficiencia de amplificación, coeficientes de determinación longitud de amplicones y temperaturas de hibridación de los oligonucleótidos usados en este trabajo.

Gene	Primer ID	Sequence	Efficiency	R <sup>2</sup>	Amplicon length	Ta °C
<i>ef1<math>\alpha</math></i>	EF1A_Fw_214_RT	GTATCTCCAAGAACGGACAG	106.44	0.99	177	60.5
	EF1A_Rv_1275_RT	GGTTGTAGCCAATCTTCTTG				
<i>gapdh</i>	GAPDH_Fw_282_RT	GGGTCATTCAGAGACGATCAAG	96.5	0.99	102	60
	GAPDH_Rv_384_RT	CGACAACGAGTTTGCCTACA				
<i>rpl5</i>	RPL5_Fw_797_RT	GAGGGAAAGACGGACTACTTTG	92.19	0.99	98	60
	RPL5_Rv_895_RT	TTGGAGAACCTCACGATCATTC				
<i>sox9</i>	SOX9_Fw_493_RT	GAAGGAATGGTAGAAGCACACC	97.91	0.99	87	61
	SOX9_Rv_580_RT	CTTGATGAGATTCAGGAAGTGACC				
<i>foxl2</i>	FOXL2_Fw_1096_RT	TGTCAGCCCTTTCACGTTTAC	101.93	0.99	106	61
	FOXL2_Rv_38_RT	CATGAACAACCTCCTGGTCGTTAG				
<i>cat</i>	CAT_Fw_456_RT	ACAGTCAGAGACCCCAAGAGG	92.36	0.98	102	57
	CAT_Rv_558_RT	GGCATCCCTGATGAAGAATATGG				
<i>sod2</i>	SOD2_Fw_642_RT	CTTCTCGGCATTGACGTATGG	97.43	0.99	102	59
	SOD2_Rv_744_RT	GTTCTCCCAGTTGACTACATTCC				
<i>gsr</i>	GSR_Fw_898_RT	GGAGTGAGAAGAGCTTTGCC	94.4	0.99	109	60
	GSR_Rv_1007_RT	GTGTGGATACGGATGAAAGAGG				
<i>ucp2</i>	UCP2_Fw_1047_RT	CCTCTGCTTTCTATAAGGGATTCCG	95.85	0.99	96	59
	UCP2_Rv_1143_RT	CTGCTCTCTTAATCTGCTCGTAG				
<i>crf</i>	CRF_Fw_513_RT	GCCCTGATGTTTCCAACCTTC	91.84	0.99	123	59
	CRF_Rv_636_RT	GGACTCTAACTCTTTCCCATCTG				
<i>gcr1</i>	GCR1_Fw_51_RT	GGCATTGTGTCTAACAGGAAAC	101.17	0.99	106	60
	GCR1_Rv_157_RT	GATGCTGGCAGAGATCATCA				

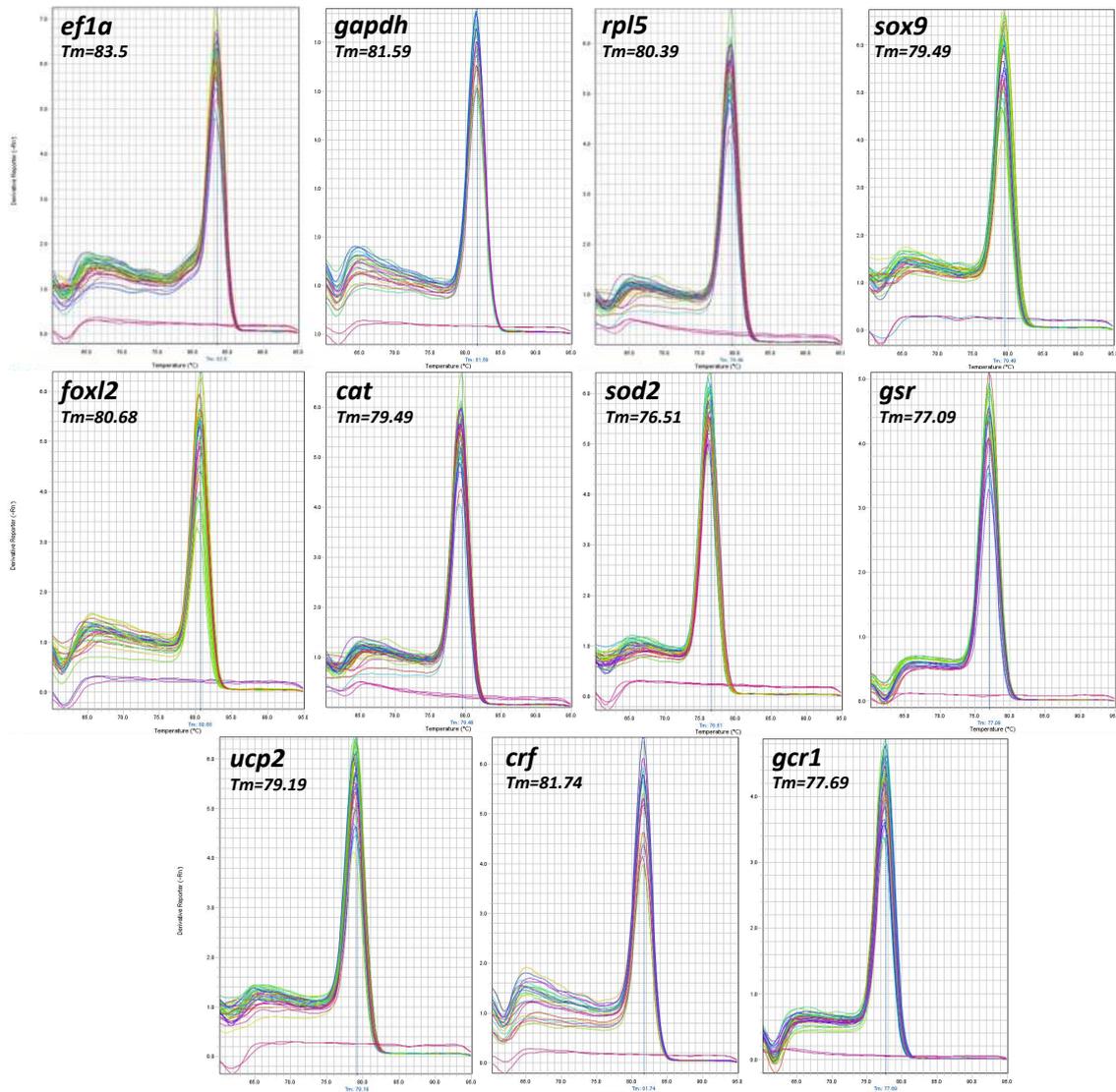


Figura 9. Curvas derivativas y temperaturas de melting de los oligonucleótidos utilizados en el experimento, incluyendo controles negativos.

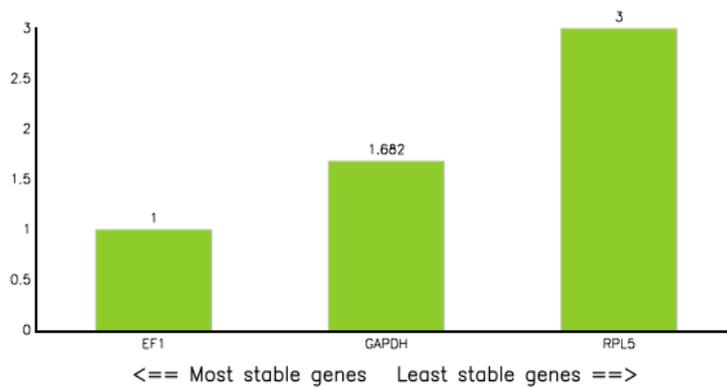


Figura 10. Análisis de estabilidad de los genes de referencia calculados con el software ReFinder.



#### 2.2.4. Análisis estadísticos

Los datos de expresión relativa por qPCR fueron calculados bajo el método de la transformada de Pfaffl (gen objetivo/ $ef1a$ /calibrador muestra control  $\pm$  SEM), que incluye los porcentajes de eficiencia del gen objetivo y del gen de referencia (Roberts *et al.*, 2014).

Específicamente, para los genes de diferenciación sexual (*sox9*, *foxl2*), los datos obtenidos del método de Pfaffl fueron calibrados, al dividir todos los valores de expresión entre el menor valor de expresión para cada gen. Posteriormente se transformaron en  $\log_2$  y fueron graficados para observar la expresión relativa de los genes por cada muestra individual, así como la tendencia de la expresión de los genes, en cada tratamiento de fotoperiodo.

El conjunto de datos se analizaron con una prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov's (95% I.C.) y la prueba de Bartlett (95% I.C.), para conocer la varianza entre los grupos. Los datos que presentaron una distribución normal fueron analizados con una prueba de t-student (95% I.C.) y los datos no paramétricos fueron analizados con una prueba de U-Mann Whitney (95% I.C.) para determinar si existían diferencias significativas entre los tratamientos.

La significancia estadística de la tasa sexual (obtenida de las observaciones histológicas y moleculares) entre los fotoperiodos fue determinada por un test exacto de Fisher (95 % I.C.). Todos los cálculos estadísticos fueron realizados con ayuda del software Graphpad prism6 (<http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>).

### 2.3. RESULTADOS

#### 2.3.1. Desarrollo gonádico y tasa sexual fenotípica.

A las 12 SPE, el desarrollo gonádico fue similar en ambos tratamientos (CS y CL). Las hembras presentaron ovarios bien definidos, con cavidad ovárica, cistos de ovogonias, ovocitos en diploteno y perinucleorales (Figura 11 A,C).

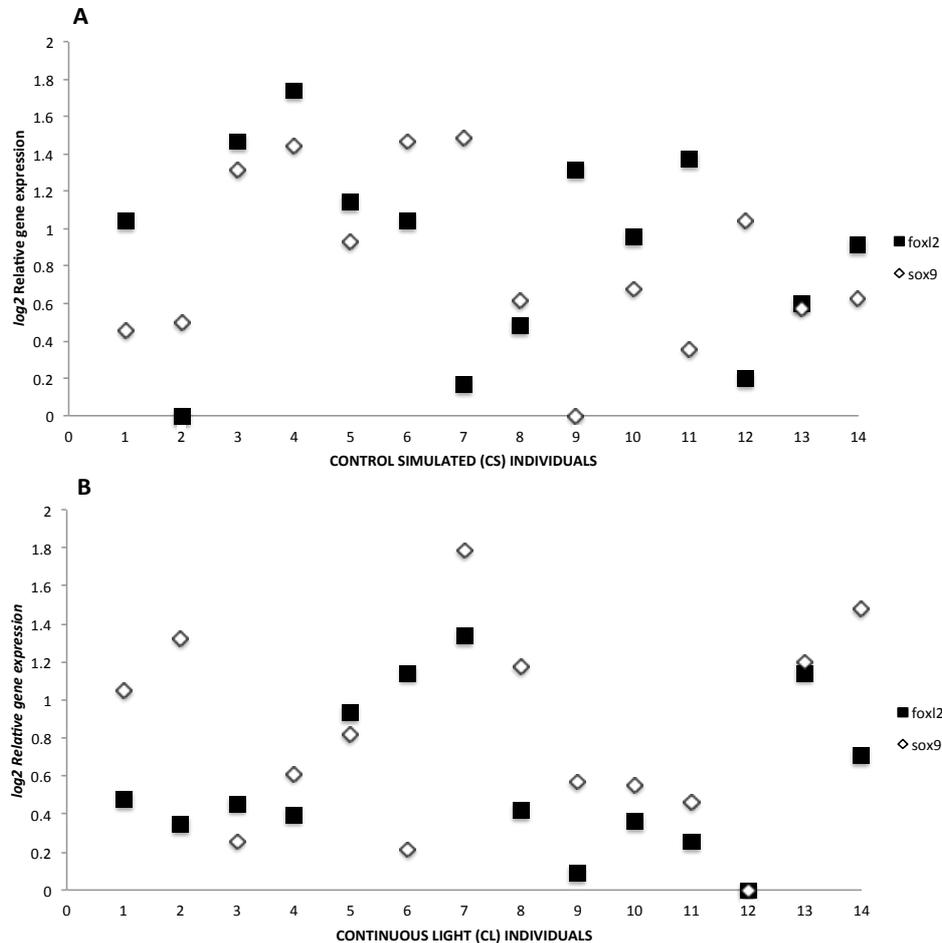
El desarrollo testicular fue también comparable en ambos tratamientos, con presencia de espermatocistos, células somáticas, ducto espermático y capilares sanguíneos (Figura 11 B,D). Estas observaciones demuestran que los tratamientos de luz continua, aplicados desde la fertilización, no afectan el desarrollo gonádico de *Chirostoma estor*.

Por el contrario, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, en las tasas de proporción sexual ( $p \leq 0.05$ ). En el fotoperiodo de luz continua (CL;  $n=45$ ) el porcentaje de machos fue de 73.3%, mientras que en el fotoperiodo simulado control fue de 40% (CS;  $n=45$ ). Estos resultados demuestran una clara respuesta de masculinización ante el tratamiento





la expresión relativa de *sox9* y *foxl2* en la porción abdominal de larvas de *Chirostoma estor*, a los 5 DPE.



**Figura 12.** Expresión relativa individual ( $\log_2$ ) de los transcritos relacionados con la diferenciación sexual *sox9* y *foxl2*. A) Fotoperiodo simulado control (CS), n=14; B) Fotoperiodo de luz continua (CL), n=14.

### 2.3.3. Expresión relativa de los genes relacionados al eje de estrés y estrés oxidativo.

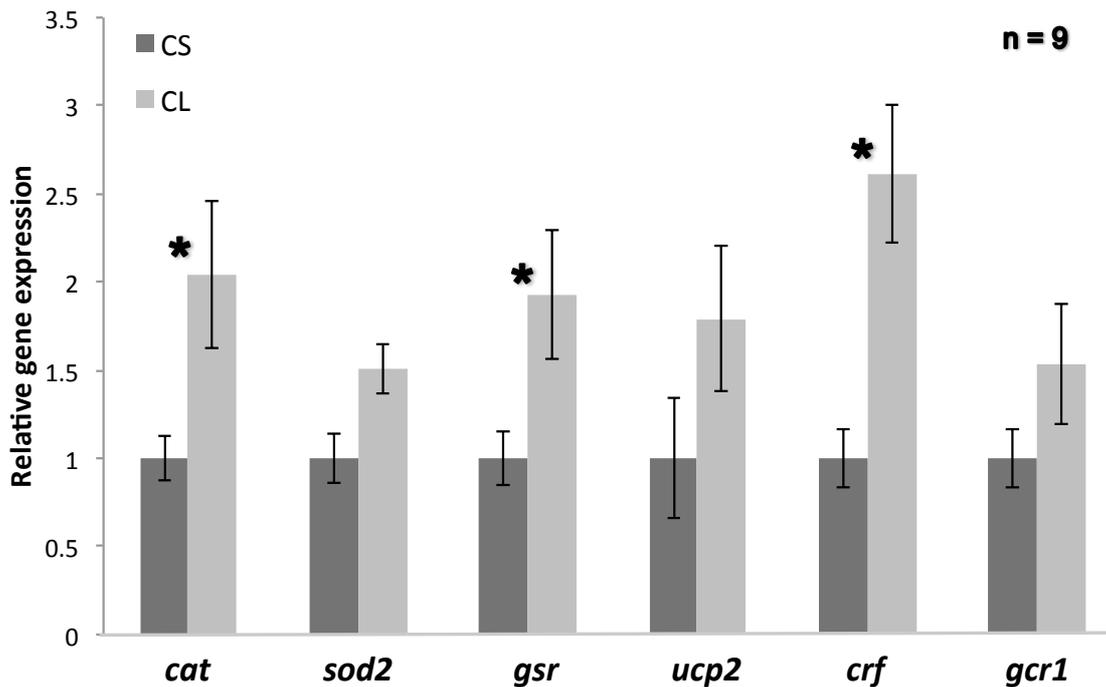
Los niveles de expresión génica de la enzima superóxido-reductasa 2 (*sod2*) y la proteína desacoplante 2 (*ucp2*) no presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ), en los cuerpos completos de larvas (n=9) de 5 DPE expuestas a los diferentes fotoperiodos.

Sin embargo, la expresión relativa de los transcritos de Catalasa (*cat*) y de Glutación reductasa (*gsr*) muestran diferencias significativas entre los tratamientos ( $p \leq 0.05$ ), con cambios en la expresión de  $2.04 \pm 0.41$  y  $1.93 \pm 0.36$  respectivamente. Estos hallazgos sugieren una relación entre las



condiciones de luz continua y la respuesta ante condiciones de estrés oxidativo (Figura 13).

Por otro lado no se presentaron diferencias significativas, entre los tratamientos ( $p > 0.05$ ), en la expresión relativa del transcripto de receptor de glucocorticoides (*gcr1*). No obstante se encontró una clara sobreexpresión del factor liberador de corticotropina (*crf*) con valores de  $2.61 \pm 0.38$  en el tratamiento de luz continua ( $p \leq 0.05$ ). Esto que sugiere una activación del eje de estrés en el fotoperiodo de CL (Figura 13).



**Figura 13.** Expresión relativa de los transcritos relacionados al estrés oxidativo (Catalasa (*cat*), Superóxido dismutasa 2 (*sod2*), Glutatión reductasa (*gsr*), Proteína desacoplante 2 (*ucp2*)) y activación del eje de estrés (Factor liberador de corticotropina (*crf*) y receptor de glucocorticoide 1 (*gcr1*)). Fotoperiodo simulado control (CS),  $n=9$ ; Fotoperiodo de luz continua (CL),  $n=9$ . Asteriscos indican diferencias significativas, en la expresión de genes, entre los tratamientos ( $p \leq 0.05$ ). Las barras indican el error estimado de la media ( $\pm$  SEM).

## 2.4. DISCUSIONES Y CONCLUSIONES

La luz es la principal señal ambiental que sincroniza los ritmos circadianos de los vertebrados. En peces se ha demostrado que la luz puede modular la alimentación, el crecimiento y la reproducción (Imsland *et al.*, 2007; Migaud *et al.*, 2010; Volkoff *et al.*, 2010; Pittman *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2015; Veras *et al.*, 2016; Takahashi *et al.*, 2016; Mata-Sotres *et al.*, 2016; Chi *et al.*, 2017).

Además, en la industria de la acuicultura la manipulación del fotoperiodo ha sido una herramienta muy útil para retrasar el inicio de la madurez sexual, con el fin de incrementar las tasas de crecimiento en los juveniles de peces



(Begtashi *et al.*, 2004; Melo *et al.*, 2014, Ammar *et al.*, 2015; Martins *et al.*, 2015; Espigares *et al.*, 2017). Sin embargo el efecto del fotoperiodo sobre el desarrollo gonádico en la fase larvaria ha recibido muy poca atención, ya que en la mayoría de los trabajos se han reportado sólo otros aspectos morfofisiológicos del desarrollo ontogénico (Villamizar *et al.*, 2011; Martín-Robles *et al.*, 2012; Politis *et al.*, 2014; Villamizar *et al.*, 2014; Di Rosa *et al.*, 2015; Mata-Sotres *et al.*, 2015; Sovrano *et al.*, 2016).

En el presente trabajo no se encontraron diferencias entre los tratamientos, en el desarrollo gonádico de los peces bancos a las 12 SPE. Estas evidencias indican que la luz continua no afecta el desarrollo temprano del ovario y testículo a nivel histológico de las larvas de *C. estor*. Sin embargo se requiere de estudios a mayor largo plazo para conocer si existen efectos en etapas posteriores del desarrollo como la edad de primera madurez.

Es bien conocido que los sistemas de determinación sexual entre los vertebrados son muy diversos (Pan *et al.*, 2016). Particularmente, el fenómeno de la determinación sexual ambiental (ESD), que ha sido reportado en anfibios (Nakamura, 2009), peces (Martínez *et al.*, 2014), invertebrados acuáticos (Grilo y Rosa, 2017) y reptiles (Pezaro *et al.*, 2016). Sin embargo los mecanismos moleculares precisos de cómo las variables ambientales influyen la plasticidad sexual, se desconocen ampliamente (Bachtrog *et al.*, 2014).

En los atherinópsidos *Leuresthes tenuis*, (Brown *et al.*, 2014) y *Chirostoma estor* (Corona-Herrera *et al.*, 2016), se ha encontrado una clara influencia de la temperatura en su sistema de determinación sexual, durante el desarrollo temprano. Adicionalmente un fotoperiodo de 15 horas luz modifica la tasa de proporción sexual de *L. tenuis* (Brown *et al.*, 2014). En invertebrados acuáticos como los balanus, anfípodos y cladóceros se ha reportado también la influencia del fotoperiodo sobre la determinación sexual, las poblaciones son masculinizadas cuando los organismos son expuestos a una fase luminosa de mayor duración (Naylor *et al.*, 1988<sup>a,b</sup>; Hobaek y Larsson, 1990; Walker, 2005; Guler *et al.*, 2012) lo que revela que el fotoperiodo puede influir en las proporciones sexuales de vertebrados e invertebrados.

Las evidencias histológicas (Figura 11) del presente trabajo en *C. estor*, indican que el fotoperiodo puede influir en la tasa sexual de los organismos. Se observó un incremento en la proporción de machos (73.3%) en las condiciones de luz continua vs 40% de presencia de machos en el fotoperiodo control. Cuando los embriones de *C. estor* son mantenidos con un tratamiento térmico de 29°C, el porcentaje de masculinización es del 82% (Corona-Herrera *et al.*, 2016). En conjunto estos trabajos demuestran que la determinación sexual de *C. estor* es influenciada de manera importante por las condiciones ambientales en las cuales se lleva a cabo su cultivo.

El presente trabajo aporta la primera evidencia que un fotoperiodo de luz continua puede tener un efecto de masculinización en una especie de



vertebrado. Los presentes resultados abren la expectativa de nuevos paradigmas en la determinación sexual ambiental en vertebrados, especialmente es necesario explorar los posibles mecanismos que vinculan la determinación sexual por fotoperiodo y temperatura en los peces. Estos resultados también sugieren que los atherinópsidos son especialmente sensibles a los cambios ambientales, por lo que es una oportunidad para estudiar los mecanismos moleculares involucrados en la determinación sexual en estos modelos de vertebrados con sensibilidad ambiental.

En peces algunos de los genes mas importantes en los procesos de diferenciación gonádica son el gen *foxl2* como factor de transcripción que puede dirigir la sobreexpresión de aromatasa y la diferenciación ovárica en fases tempranas del desarrollo (Wang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2015). Así como el gen *sox9* el cual es un factor de transcripción que está involucrado en la diferenciación testicular (Rodríguez-Mari *et al.*, 2005; Ijiri *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2010; Vizziano-Cantonnet *et al.*, 2016).

Los análisis de expresión relativa de los transcritos *foxl2* y *sox9* en *C. estor* no muestran diferencias significativas entre los tratamientos ( $p > 0.05$ ), a pesar de que se observa una tendencia de mayor expresión en *sox9* presente en el 64.29% de los individuos bajo tratamiento de luz continua vs 35.71% en los individuos mantenidos en el fotoperiodo control. Este resultado coincide con el mayor porcentaje de machos encontrado por el análisis de histología, en el fotoperiodo de luz continua. Incluso, se encontró también una tendencia de sobreexpresión de *foxl2* solo en el 21.74% de los individuos bajo el efecto de luz continua, mientras que el 57.14% de los individuos del tratamiento control presentan una mayor expresión de dicho gen (Figura 12 A, B).

No obstante los resultados sugieren que en larvas de 5 DPE, los niveles de expresión transcripcional se encuentran cercanos a su estado basal (no inducidos); por lo que no es posible observar diferencias significativas entre los tratamientos. Por lo que es necesario realizar en estudios futuros que incluyan el análisis de las muestras durante toda la ontogenia temprana, para definir exactamente el periodo de la diferenciación sexual molecular en *C. estor*.

Por otro lado, la exposición de los organismos a la luz visible incrementa la producción de ROS. Sin embargo el vínculo entre el sistema antioxidante y la exposición a luz continua ha sido escasamente investigado en vertebrados (Wilking *et al.*, 2013; Giannetto *et al.*, 2014; Purushothaman *et al.*, 2015). En este trabajo se observó que en las larvas de *C. estor* expuestas al fotoperiodo de luz continua, se induce una sobreexpresión significativa de los transcritos de glutatión reductasa (*gsr*) y catalasa (*cat*), en comparación con el fotoperiodo control ( $p \leq 0.05$ ). Sin embargo para los transcritos de superóxido-reductasa 2 *sod2* y proteína desacoplante 2 *ucp2* no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ( $p > 0.05$ ), Figura 13.



Estos hallazgos sugieren que la luz continua genera condiciones de estrés oxidativo, que activa la transcripción de las enzimas *cat* y *gsr*, relacionadas con el procesamiento del  $H_2O_2$ . Lo que coincide con los resultados reportados en el hígado de juveniles de 6 meses de *G. morhua*, donde la iluminación continua también aumenta la expresión de los genes *cat* y *gsr*, además de aumentar la expresión de *sod2* (Giannetto *et al.*, 2014). Igualmente en adultos de pez cebra (*D. rerio*) se observa una sobreexpresión de *sod1* bajo condiciones de luz continua (Purushothaman *et al.*, 2015). En contraste, en condiciones de luz continua en el pez blanco no se detectó una sobreexpresión de *sod2*, la principal enzima encargada de convertir el anión  $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$ . Dado que las dos enzimas (*cat*, *gsr*) relacionadas con la degradación del  $H_2O_2$  celular si presentan niveles de sobreexpresión, es posible que el transcrito de *sod2* no se encuentre en su fase de mayor activación al momento del muestreo (Figura 13).

Las proteínas de membrana *Ucps* son transportadores mitocondriales que desacoplan a OXPHOS por los movimientos en contra del gradiente de protones (Krauss *et al.*, 2005), en la dorada *Sparus aurata* con condiciones de iluminación 12L:12D *ucp1* presenta una acrofase al inicio de la fase oscura, sin embargo bajo condiciones de estrés no se presentan diferencias significativas (Vera *et al.*, 2014). Específicamente para *ucp2* se ha reportado una sobreexpresión ante una exposición a xenobióticos (Liu *et al.*, 2008; Jin *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2012) restricción alimenticia en corazón/músculo rojo (Bermejo-Nogales *et al.*, 2014) y temperatura (Mark *et al.*, 2006), además de una disminución de la expresión ante restricción alimenticia en músculo blanco y eritrocitos bajo condiciones de hipoxia (Bermejo-Nogales *et al.*, 2014), sin embargo hasta la fecha no existen estudios de referencia bajo condiciones de iluminación continua.

Un estudio reciente en ratones indica que la sobreexpresión de UCP2 no altera la producción de ROS y la actividad de desacoplamiento, pero promueve la utilización de la ruta de oxidación de ácidos grasos, por lo que la actividad real de UCP2 en el metabolismo energético, permanece aún bajo discusión (Kukat *et al.*, 2014). En el pez blanco no se encuentran diferencias significativas entre los tratamientos para los niveles de expresión de *ucp2* (Figura 13), esto sugiere que OXPHOS está igualmente acoplada y se encuentra activa en la síntesis de ATP en ambos tratamientos al tiempo de muestreo, sin embargo en base a los estudios anteriormente mencionados no se descarta que *ucp2* en peces cumpla otras funciones aún desconocidas que necesitan ser abordadas en un futuro.

El aumento selectivo de la expresión de *cat* y *gsr*, pero no de *sod2* y *ucp2*, sugiere que en larvas de *C. estor* la luz continua aumenta la producción y activa las rutas de detoxificación para hacer frente a las condiciones de estrés oxidativo por  $H_2O_2$ . Por lo que la participación de *Sod2* y *Ucp2* no se encuentra clarificada, ya que aunque existe una tendencia de mayor expresión en luz continua no se presentan diferencias significativas. En futuros trabajos se debe



de estudiar la expresión de los genes relativos al estrés oxidativo directamente en los tejidos (cerebro, hígado, gónada), a través de estadios de desarrollo (embrión, eclosión, larva), así como en diferentes condiciones de iluminación (fase oscura, fase luminosa, intensidad y longitudes de onda).

Conocer el papel que juegan las diferentes longitudes de onda en la respuesta ante el estrés oxidativo es particularmente interesante. Reportes en *Paralichthys olivaceus* y *Carassius auratus* indican que la exposición a altas temperaturas incrementa el daño al DNA, la apoptosis, la peroxidación lipídica y la inmunosupresión. Sin embargo, tratamientos lumínicos con luz LED de longitudes de onda en el color verde disminuyen los efectos del estrés oxidativo causado por la temperatura (Kim *et al.*, 2016; Jung *et al.*, 2016) al igual que tratamientos con el antioxidante melatonina (Jung *et al.*, 2016).

La melatonina podría cumplir una doble acción en la reproducción de los peces, como una hormona que determina el patrón temporal de desove y como un potente antioxidante que regula el eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada y la maduración de los ovocitos (Maitra y Hassan 2016). Estas aproximaciones recientes demuestran que el vínculo entre las variables ambientales y el estrés oxidativo está evaluándose como una pieza importante en el control de la fisiología. Por lo que es importante diseñar proyectos para conocer si la determinación sexual es afectada por el estrés oxidativo ante los cambios ambientales en peces y vertebrados.

Por otro lado en las larvas de *C. estor* la iluminación continua induce la sobreexpresión de los transcritos del factor liberador de corticotropina *crf* ( $p \leq 0.05$ ). Sin embargo en los transcritos del receptor de glucocorticoides *gcr1* no se observan diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre tratamientos (Figura 13).

La sobreexpresión de *crf* en larvas de *C. estor* sugiere la activación del eje de estrés, provee evidencia de la correlación de la respuesta de estrés y el efecto de la masculinización por fotoperiodo. Sin embargo se requiere de mayores esfuerzos de investigación para poder obtener conclusiones definitivas de la participación del eje de estrés en la determinación sexual de *C. estor*. Por ejemplo determinar los niveles de la hormona cortisol y la expresión de otros genes relacionados con la ruta de masculinización en la gónada como esteroide 5 alfa-reductasa tipo 1 (*sdr5 $\alpha$ 1*), 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa 2 (*11 $\beta$ -hsd2*) y receptores de andrógenos (*ar*) (Castañeda *et al.*, 2014).

Recientemente se ha sugerido una comunicación entre los ejes de reproducción Hipotálamo- Hipófisis- Gónada (Gnrh- Fsh/Lh- andrógenos); Tiroideo Hipotálamo- Hipófisis- Tiroide (Trh- Tsh- T4/T3/andrógenos) y el eje de estrés Hipotálamo- Hipófisis- Adrenales/Interrenales (Crf- Acth- Cortisol/andrógenos) para dirigir la diferenciación testicular y la masculinización en peces y vertebrados (Castañeda *et al.*, 2014). Cuando las condiciones de iluminación son constantes en la tilapia *Oreochromis niloticus* (Biswas *et al.*, 2004), la



brema *Pagrus major* (Biswas *et al.*, 2006), la brema rayada *Oplegnathus fasciatus* (Biswas *et al.*, 2008), la dorada *Sparus aurata* (López-Olmeda *et al.*, 2009), el salmón (Huang *et al.*, 2010) en el lenguado *Solea senegalensis* (Oliveira *et al.*, 2013), la trucha *Oncorhynchus mykiss* (Hernández-Pérez *et al.*, 2015) y la perca *Perca fluviatilis* (Brüning *et al.*, 2015) no se encuentran diferencias significativas en los niveles de cortisol entre tratamientos, esto sugiere que la luz continua puede afectar los ritmos circadianos pero presenta poca influencia sobre la producción del glucocorticoide.

Como se mencionó la expresión del transcripto de *gcr1* no exhibe diferencias significativas entre los tratamientos en las larvas de *C. estor*. Esto coincide con observaciones en larvas del pez cebra *D. rerio*, ya que no se observan cambios en la expresión del receptor de glucocorticoides cuando las larvas se exponen a tratamientos con Dexametasona (agonista de cortisol) o bajo condiciones de hipoxia (Wilson *et al.*, 2016). Incluso en tratamientos de cortisol en embriones de pez cebra tampoco se observan diferencias significativas entre la expresión del receptor de glucocorticoides (Nesan y Vijayan, 2012).

Sin embargo, en larvas de lubina *D. labrax* se observa una reducción de la expresión del transcripto de *gcr1* pero no en el de *gcr2*, ni en el receptor de mineral corticoides (*mr*) cuando se exponen a condiciones de estrés no predecible de baja intensidad; que consiste en la aplicación de tratamientos lumínicos (aumento de intensidad lumínica, presencia de luz en la fase oscura) incremento en las condiciones de aereación y/o presencia de un objeto externo (Fokos *et al.*, 2017).

Estos resultados contrastantes, en los niveles de expresión de *gcr1* entre larvas de peces indican que la respuesta ante efectos estresantes son especie-específicos, dependientes de la intensidad y el tipo de factor estresante, por lo que se requiere de más estudios a través del desarrollo, en diferentes tejidos y de las diferentes isoformas de los receptores para contar con una visión clara de la participación de las rutas de recepción de glucocorticoides, en larvas de *C. estor* expuestos a luz continua.

Por último, todas las evidencias e ideas expuestas en el presente trabajo, sobre los procesos de determinación/diferenciación sexual y la relación entre la exposición a factores ambientales con el estrés oxidativo como primera línea de respuesta ante los cambios ambientales. Ofrecen sustento científico para formular algunas preguntas puntuales que ayuden a comprender mejor el fenómeno de la determinación sexual ambiental en vertebrados.

Primero, ¿Cual es la interacción entre los genes maestros de determinación sexual y el estrés oxidativo?, Segundo, ¿El estrés oxidativo modula el eje de estrés, el eje tiroideo y el eje de reproducción para masculinizar a los organismos?. Tercero, ¿Cual es el papel del estrés oxidativo en la diferenciación y apoptosis gonádica en vertebrados?. Cuarto, ¿Es posible producir una línea de organismos homogaméticos con un control total de la



determinación sexual ambiental?, Quinto ¿Es posible modular la determinación/diferenciación sexual con otros factores que induzcan estrés oxidativo en los peces?.

Para explorar estas hipótesis, se requiere diseñar experimentos que respondan a las preguntas anteriormente planteadas. Para comprender a profundidad los mecanismos moleculares que están detrás de la sensibilidad de los organismos a factores ambientales, lo cuales influyen en los procesos de determinación/diferenciación y plasticidad sexual, en vertebrados.

## 2.5. BIBLIOGRAFÍA

- Adolfi MC, Carreira ACO, Jesus LWO, Bogerd J, Funes RM, Schartl M, Sogayar MC, Borella MI (2015) Molecular cloning and expression analysis of *dmrt1* and *sox9* during gonad development and male reproductive cycle in the lambari fish, *Astyanax altiparanae*. *Repro Biol Endo*. 13:2. doi:10.1186/1477-7827-13-2
- Alderman SL and Bernier NJ (2009) Ontogeny of the corticotropin-releasing factor system in zebrafish. *Gen Comp Endocrinol*. 164(1):61-9. doi: 10.1016/j.ygcen.2009.04.007
- Alonso-Alvarez C, Bertrand S, Faivre B, Chastel O, Sorci G (2007) Testosterone and oxidative stress: the oxidation handicap hypothesis. *Proc R Soc Biol*. 274 819-825. doi: 10.1098/rspb.2006.3764
- Alsop D and Vijayan MM (2009) Molecular programming of the corticosteroid stress axis during zebrafish development. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 153(1):49-54. doi: 10.1016/j.cbpa.2008.12.008
- Ammar B, Teletchea F, Milla S, Ndiaye WN, Ledoré Y, Missaoui H, Fontaine P (2015) Continuous lighting inhibits the onset of reproductive cycle in pikeperch males and females. *Fish Physiol Biochem*. 41(2):345-56. doi: 10.1007/s10695-014-9987-7
- Andrews ZB, Liu ZW, Wallingford N, Erion DM, Borok E, Friedman JM, et al (2008) UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nat*. 454, 846–851. doi:10.1038/nature07181
- AnvariFar H, Amirkolaie AK, Miandare HK et al. (2017) Apoptosis in fish: environmental factors and programmed cell death. *Cell Tissue Res*. 368: 425. doi:10.1007/s00441-016-2548-x
- Aris AZ, Shamsuddin AS, Praveena SM (2014) Occurrence of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. *Env Int*. 69(0):104–119. doi: 10.1016/j.envint.2014.04.011
- Bachtrog D, Mank JE, Peichel CL, Kirkpatrick M, Otto SP, et al. (2014) Sex Determination: Why So Many Ways of Doing It? *PLoS Biol*. 12(7): e1001899. doi:10.1371/journal.pbio.1001899
- Baroiller JF, D'Cotta H, Saillant E (2009) Environmental effects on fish sex determination and differentiation. *Sex. Dev*. 3:118–135. doi: 10.1159/000223077
- Baroiller JF and D'Cotta H (2016) The Reversible Sex of Gonochoristic Fish: Insights and Consequences. *Sex Dev*. 10:242-266. Doi:10.1159/000452362
- Baron D, Houlgatte R, Fostier A, Guiguen Y (2005) Large-scale temporal gene expression profiling during gonadal differentiation and early gametogenesis in rainbow trout. *Biol Reprod*. 73:959-966. doi 10.1095/biolreprod.105.041830
- Begtashi I, Rodriguez L, Moles G, Zanuy S, Carrillo M (2004) Long-term exposure to continuous light inhibits precocity in juvenile male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). I. Morphological aspects. *Aqua*. 241:539–559. doi: 10.1016/j.aquaculture.2004.07.011
- Benayoun BA, Batista F, Auer J, Dipietromaria A, L'Hôte D, De Baere E, Veitia RA (2009) Positive and negative feedback regulates the transcription factor FOXL2 in response to cell stress: evidence for a regulatory imbalance induced by disease-causing mutations. *Hum Mol Genet*. 15;18(4):632-44. doi: 10.1093/hmg/ddn389
- Benayoun BA, Georges AB, L'Hôte D, Andersson N, Dipietromaria A, Todeschini AL, Caburet S, Bazin C, Anttonen M, Veitia RA (2011) Transcription factor FOXL2 protects granulosa cells from stress and delays cell cycle: role of its regulation by the SIRT1 deacetylase. *Hum Mol Genet*. 20(9):1673-86. doi: 10.1093/hmg/ddr042
- Bermejo-Nogales A, Calduch-Giner JA, Pérez-Sánchez J (2010) Gene expression survey of mitochondrial uncoupling proteins (UCP1/UCP3) in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) *J Comp Physiol B*. 180: 685. doi:10.1007/s00360-009-0441-6



- Bermejo-Nogales A, Calduch-Giner JA, Pérez-Sánchez J (2014) Tissue-specific gene expression and functional regulation of uncoupling protein 2 (UCP2) by hypoxia and nutrient availability in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): implications on the physiological significance of UCP1-3 variants. *Fish Physiol Biochem.* 40(3):751-62. doi: 10.1007/s10695-013-9882-7
- Birnie-Gauvin K, Peiman KS, Larsen MH, Aarestrup K, Willmore WG, Cooke SJ (2017) Short-term and long-term effects of transient exogenous cortisol manipulation on oxidative stress in juvenile brown trout. *J Exp Biol.* 220(Pt 9):1693-1700. doi: 10.1242/jeb.155465
- Biswas AK, Maita M, Yoshizaki G, Takeuchi T (2004) Physiological responses in Nile tilapia exposed to different photoperiod regimes. *J Fish Biol* 65:811–821. doi: 10.1111/j.0022-1112.2004.00487.x
- Biswas AK, Seoka M, Tanaka Y, Takii K, Kumai H (2006) Effect of photoperiod manipulation on the growth performance and stress response of juvenile red sea bream (*Pagrus major*). *Aqua.* 258, 350–356. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.03.048
- Biswas AK, Seoka M, Ueno K, Yong ASK, Biswas BK, Kim YS, et al. (2008) Growth performance and physiological responses in striped knifejaw, *Oplegnathus fasciatus*, held under different photoperiods. *Aqua.* 279, 42–46. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.04.007
- Blasco M, Fernandino JI, Guilgur LG, Strüssmann CA, Somoza GM, Vizziano-Cantonnet D (2010) Molecular characterization of *cyp11a1* and *cyp11b1* and their gene expression profile in pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) during early gonadal development. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 156: 110–118. doi: 10.1016/j.cbpa.2010.01.006
- Boulanger L, Pannetier M, Gall L, Allais-Bonnet A, Elzaiat M, et al. (2014) FOXL2 is a female sex-determining gene in the goat. *Curr Biol.* 24: 404–408. doi: 10.1016/j.cub.2013.12.039
- Brennan J and Capel B (2004) One tissue two fates: Molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nat Rev.* 5:509-521. doi :10.1038/nrg1381
- Brown EE, Baumann H, Conover DO (2014) Temperature and photoperiod effects on sex determination in a fish. *J Exp Mar Biol Ecol.* 461, 39-43. doi:10.1016/j.jembe.2014.07.009
- Brüning A, Hölker F, Franke S, Preuer T, Kloas W (2015) Spotlight on fish: light pollution affects circadian rhythms of European perch but does not cause stress. *Sci Total Environ* 511:516–522. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.12.094
- Bull JJ (1983) Evolution of sex determining mechanisms. Menlo Park: Benjamin/ Cummings. 316p.
- Bury NR, Sturm A (2007) Evolution of the corticosteroid receptor signaling pathway in fish. *Gen Comp Endocrinol.* 153, 47–56. doi: 10.1016/j.ygcen.2007.03.009
- Carvalho CS, Bernusso VA, Fernandes MN (2015) Copper levels and changes in pH induce oxidative stress in the tissue of curimbata (*Prochilodus lineatus*) *Aquat Toxicol.* 167:220-7. doi: 10.1016/j.aquatox.2015.08.003
- Casas L, Saborido-Rey F, Ryu T, Michell C, Ravasi T, Irigoien X (2016) Sex Change in Clownfish: Molecular Insights from Transcriptome Analysis. *Sci Rep.* 6:35461. doi:10.1038/srep35461
- Castañeda Cortés DC, Langlois VS, Fernandino JI (2014) Crossover of the Hypothalamic Pituitary–Adrenal/Interrenal, –Thyroid, and –Gonadal Axes. *Front Endo.* doi:10.3389/fendo.2014.00139
- Chainy GBN, Paital B, Dandapat J (2016) An Overview of Seasonal Changes in Oxidative Stress and Antioxidant Defence Parameters in Some Invertebrate and Vertebrate Species. *Scient.* 6126570. doi:10.1155/2016/6126570
- Chakraborty T, Zhou LY, Chaudhari A, Iguchi T, Nagahama Y (2016) Dmy initiates masculinity by altering *Gsdf/Sox9a2/Rspo1* expression in medaka (*Oryzias latipes*). *Sci Rep.* 6, 19480. doi: 10.1038/srep19480
- Chandrasekar G, Lauter G, Hauptmann G (2007) Distribution of corticotropin-releasing hormone in the developing zebrafish brain. *J Comp Neurol.* 505: 337–351. doi:10.1002/cne.21496
- Chen Q, Li C, Gong Z, Chan EC, Snyder SA, Lam SH (2017) Common deregulated gene expression profiles and morphological changes in developing zebrafish larvae exposed to environmental-relevant high to low concentrations of glucocorticoids. *Chemo.* 172:429-439. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.01.036
- Cheng CH, Yang FF, Ling RZ, Liao SA, Miao YT, Ye CX, Wang AL (2015) Effects of ammonia exposure on apoptosis, oxidative stress and immune response in pufferfish (*Takifugu obscurus*). *Aquat Toxicol.* 164:61-71. doi: 10.1016/j.aquatox.2015.04.004
- Chi L, Li X, Liu Q, Liu Y (2017) Photoperiod regulate gonad development via kisspeptin/kissr in hypothalamus and saccus vasculosus of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Wolfe A, ed. *PLoS ONE.* 2017;12(2):e0169569. doi:10.1371/journal.pone.0169569



- Choi CY, Shin HS, Choi YJ, Kim NN, Lee J, Kil GS (2012) Effect of LED light spectra on starvation-induced oxidative stress in the cinnamon clownfish *Amphiprion melanopus*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 163, 357–363. doi:10.1016/j.cbpa.2012.07.005
- Choi JY, Kim TH, Choi YJ, Kim NN, Oh SY, Choi CY (2016) Effects of various LED light spectra on antioxidant and immune response in juvenile rock bream, *Oplegnathus fasciatus* exposed to bisphenol A, *Env Tox Pharma.* 45,140-149. doi: 10.1016/j.etap.2016.05.026
- Circu ML and Aw TY (2010) Reactive oxygen species, cellular redox systems and apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 48(6):749-762. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022
- Colli-Dula R-C, Martyniuk CJ, Kroll KJ, et al. (2014) Dietary exposure of 17-alpha ethinylestradiol modulates physiological endpoints and gene signaling pathways in female largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Aqua tox.* 156:148-160. doi:10.1016/j.aquatox.2014.08.008
- Conover, DO and Kynard, BE (1981) Environmental sex determination: interaction of temperature and genotype in fish. *Sci.* 213, 577–579. doi: 10.1126/science.213.4507.577
- Corona-Herrera GA, Tello-Ballinas JA, Hattori RS, Martínez-Palacios CA, Strüssmann CA, Cárdenas-Reygadas R & Martínez-Chávez CC (2016) Gonadal differentiation and temperature effects on sex determination in the freshwater pike silverside *Chirostoma estor* Jordan 1880. *Environ Biol Fish.* 99:463-471. doi:10.1007/s10641-016-0491-z
- Costantini D, Marasco V, Møller AP, (2011) A meta-analysis of glucocorticoids as modulators of oxidative stress in vertebrates. *J Comp Physiol B.* 181: 447. doi:10.1007/s00360-011-0566-2
- Cowan M, Azpeleta C, López-Olmeda JF (2017) Rhythms in the endocrine system of fish: a review. *J Comp Physiol B.* 187(8):1057-1089. doi: 10.1007/s00360-017-1094-5
- Craig PM, Massarsky A, Moon TW (2013) Understanding glucose uptake during methionine deprivation in incubated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes using a non-radioactive method. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 166(1):23-9. doi: 10.1016/j.cbpb.2013.06.005
- Cruz SA, Lin C-H, Chao P-L, Hwang P-P (2013) Glucocorticoid Receptor, but Not Mineralocorticoid Receptor, Mediates Cortisol Regulation of Epidermal Ionocyte Development and Ion Transport in Zebrafish (*Danio Rerio*). *PLoS ONE* 8(10): e77997. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077997>
- Cruz MHL, Leal CLV, Cruz JF, Tan DX, Reiter RJ (2014) Role of melatonin on production and preservation of gametes and embryos: A brief review. *Anim Repro Sci.* 145; 150-160. doi: 10.1016/j.anireprosci.2014.01.011
- Cui Z, Liu Y, Wang W, et al.(2017) Genome editing reveals *dmt1* as an essential male sex-determining gene in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Sci Rep.* 2017;7:42213. doi:10.1038/srep42213
- D'Almeida V, Lobo LL, Hipolide DC, de Oliveira AC, Nobrega JN, and Tufik S (1998) Sleep deprivation induces brain region-specific decreases in glutathione levels. *Neuroreport.* 9: 2853–2856. doi: 10.1097/00001756-199808240-00031
- Denny P, Swift S, Brand N, Dabhade N, Barton P, Ashworth A (1992) A conserved family of genes related to the testis determining gene *SRY*. *Nucleic Acids Res.* 20:2887. doi: 10.1002/ijc.28147
- Devlin RH, Nagahama Y (2002) Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aqua.* 208:191-364. doi:10.1016/S0044-8486(02)00057-1
- Di Rosa V, Frigato E, López-Olmeda JF, Sánchez-Vázquez FJ, Bertolucci C (2015) The Light Wavelength Affects the Ontogeny of Clock Gene Expression and Activity Rhythms in Zebrafish Larvae. *PLoS ONE* 10(7): e0132235. doi:10.1371/journal.pone.0132235
- Díaz N and Piferrer F (2015) Lasting effects of early exposure to temperature on the gonadal transcriptome at the time of sex differentiation in the European sea bass, a fish with mixed genetic and environmental sex determination. *BMC Gen.* 16(1):679. doi:10.1186/s12864-015-1862-0
- Drougard A, Fournel A, Valet P and Knauf C (2015) Impact of hypothalamic reactive oxygen species in the regulation of energy metabolism and food intake. *Front. Neurosci.* 9:56. doi: 10.3389/fnins.2015.00056
- DuRant SE, Hopkins WA, Carter AW, Kirkpatrick LT, Navara KJ, Hawley DM (2016) Incubation temperature causes skewed sex ratios in a precocial bird. *J Exp Biol.* 219: 1961-1964. doi: 10.1242/jeb.138263
- Edgar RS, Green EW, Zhao Y, et al. (2012) Peroxiredoxins are conserved markers of circadian rhythms. *Nat.* 485(7399):459-464. doi:10.1038/nature11088
- Elzaïat M, Todeschini A-L, Caburet S, Veitia RA (2017). The genetic make-up of ovarian development and function: the focus on the transcription factor *FOXL2*. *Clin Genet.* 91: 173–182. doi:10.1111/cge.12862



- Emre Y and Nübel T (2010) Uncoupling protein UCP2: When mitochondrial activity meets immunity, *FEBS Lett.* 584,8:1437-1442. doi:10.1016/j.febslet.2010.03.014
- Endal HP, Taranger GL, Stefansson SO, Hansen T (2000) Effects of continuous additional light on growth and sexual maturity in Atlantic salmon, *Salmo salar*, reared in sea cages. *Aqua.* 191: 337–349. doi: 10.1016/S0044-8486(00)00444-0
- Espigares F, Rocha A, Gómez A, Carrillo M, Zanuy S (2017) Photoperiod modulates the reproductive axis of European sea bass through regulation of *kiss1* and *gnrh2* neuronal expression. *Gen Comp Endocrinol.* 240:35-45. doi: 10.1016/j.ygcen.2016.09.007
- Evans BJ, Pyron RA, Wiens JJ (2012) Polyploidization and sex chromosome evolution in amphibians. *Polyploid Gen Evol.*, eds Soltis PS, Soltis DE (Springer, Berlin), pp 385–410 doi: 10.1007/978-3-642-31442-1\_18
- Everson CA, Laatsch CD, and Hogg N.(2005) Antioxidant defense responses to sleep loss and sleep recovery. *Am J Phys Regul Integr Comp Physiol.* 288: R374–R383, doi: 10.1152/ajpregu.00565.2004
- Fan Z, Zou Y, Jiao S, Tan X, Wu Z, Liang D, Zhang P, You F (2017) Significant association of *cyp19a* promoter methylation with environmental factors and gonadal differentiation in olive flounder *Paralichthys olivaceus*, *Comp Biochem Physiol Part A: Mol & Int Physiol.* 208,70-79. doi: 10.1016/j.cbpa.2017.02.017.
- Fernandino JI, Hattori RS, Kimura H, Strüssmann CA, Somoza GM (2008) Expression profile and estrogenic regulation of anti-Müllerian hormone during gonadal development in pejerrey *Odontesthes bonariensis*, a teleost fish with strong temperature-dependent sex determination. *Dev Dyn.* 237: 3192–3199. doi:10.1002/dvdy.21731
- Fernandino JI, Hattori RS, Kishii A, Strüssmann CA, Somoza GM (2012) The Cortisol and Androgen Pathways Cross Talk in High Temperature-Induced Masculinization: The 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase as a Key Enzyme. *Endo.* 153 (12): 6003-6011. doi: 10.1210/en.2012-1517
- Fernandino JI, Hattori RS, Moreno Acosta OD, Strüssmann CA, Somoza GM (2013) Environmental stress-induced testis differentiation: androgen as a by-product of cortisol inactivation. *Gen Comp Endocrinol.* 1;192:36-44. doi: 10.1016/j.ygcen.2013.05.024
- Fokos S, Pavlidis M, Yiotis T, Tsalafouta A, Papandroulakis N, Dermon CR (2017) Early life low intensity stress experience modifies acute stress effects on juvenile brain cell proliferation of European sea bass (*D. Labrax*). *Behav Brain Res.* 317:109-121. doi: 10.1016/j.bbr.2016.09.026
- Foster JW, Brennan FE, Hampikian GK, Goodfellow PN, Sinclair AH, Lovell-Badge R, Selwood L, Renfree MB, Cooper DW, Graves JA (1992) Evolution of sex determination and the Y chromosome: SRY-related sequences in marsupials. *Nat.* 359:531–533. doi:10.1038/359531a0
- Fuzzen ML, Alderman SL, Bristow EN, Bernier NJ (2011) Ontogeny of the corticotropin-releasing factor system in rainbow trout and differential effects of hypoxia on the endocrine and cellular stress responses during development. *Gen Comp Endocrinol.* 170(3):604-12. doi: 10.1016/j.ygcen.2010.11.022
- Gallo-Payet N (2016) Adrenal and extra-adrenal functions of ACTH. *J Mol Endocrinol.* 21.15-0257. doi: 10.1530/JME-15-0257
- Garratt M and Brooks RC (2012) Oxidative stress and condition-dependent sexual signals: more than just seeing red. *Proc Roy Soc B: Biol Sci.* 279(1741):3121-3130. doi:10.1098/rspb.2012.0568
- Georges A, L'Hôte D, Todeschini AL, et al. (2014) The transcription factor FOXL2 mobilizes estrogen signaling to maintain the identity of ovarian granulosa cells. *Rossant J, ed. eLife.* 3:e04207. doi:10.7554/eLife.04207
- Giannetto A, Fernandes JMO, Nagasawa K, Mauceri A, Maisano M, De Domenico E, Cappello T, Oliva S, Fasulo S (2014) Influence of continuous light treatment on expression of stress biomarkers in Atlantic cod. *Dev Comp Immuno.* 44 (2014) 30–34. doi:10.1016/j.dci.2013.11.011
- Godwin J (2009) Social determination of sex in reef fishes. *Sem Cell & Dev Biol.* 20, 264–270. doi: 10.1016/j.semcdb.2008.12.003
- Grilo TF and Rosa R (2017) Intersexuality in aquatic invertebrates: Prevalence and causes. *Sci Total Environ.* 592:714-728. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.02.099
- Guiguen Y, Fostier A, Piferrer F, Chang CF (2010) Ovarian aromatase and estrogens: A pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *Gen Comp Endocrinol.* 165:352-366. doi: 10.1016/j.ygcen.2009.03.002
- Guler Y, Short S, Kile P, Ford AT, (2012) Integrating field and laboratory evidence for environmental sex determination in the amphipod, *Echinogammarus marinus*. *Mar Biol.* 159:2885–2890. doi: 10.1007/s00227-012-2042-2



- Hansen T, Karlsen O, Taranger GL, Hemre GI, Holm JC, et al. (2001) Growth, gonadal development and spawning time of Atlantic cod (*Gadus morhua*) reared under different photoperiods. *Aqua*. 203:51–67. doi: 10.1016/S0044-8486(01)00610-X
- Hardeland R, Coto-Montes A, Poeggeler B (2003) Circadian rhythms, oxidative stress, and antioxidative defense mechanisms. *Chronobiol Int*. 20,6:921-62.. doi:10.1081/CBI-120025245
- Hattori RS, Fernandino JI, Kishii A, Kimura H, Kinno T, Oura M, Somoza GM, Yokota, M, Strussmann, CA, Watanabe, S (2009) Cortisol-induced masculinization: does thermal stress affect gonadal fate in pejerrey, a teleost fish with temperature-dependent sex determination?. *PLoS ONE*, 4:e6548. doi: 10.1371/journal.pone.0006548
- Hattori RS, Murai Y, Oura M, Masuda S, Majhi SK, Sakamoto T, Fernandino JI, Somoza, GM, Yokota, M, Strussmann, CA (2012) A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. *PNAS*. 109:2955-2959. doi: 10.1073/pnas.1018392109
- Hayashi Y, Kobira H, Yamaguchi T, Shiraishi E, Yazawa T, Hirai T, Kamei Y, Kitano T (2010) High temperature causes masculinization of genetically female medaka by elevation of cortisol. *Mol Reprod Dev*. 77, 679–686. doi: 10.1002/mrd.21203
- Hernández-Pérez J, Míguez JM, Librán-Pérez M, Otero-Rodiño C, Naderi F, Soengas JL, López-Patiño MA (2015) Daily rhythms in activity and mRNA abundance of enzymes involved in glucose and lipid metabolism in liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Influence of light and food availability. *Chronobiol Int*. 32:1391–1408. doi: 10.3109/07420528.2015.1100633
- Herpin A, Adolphi MC, Nicol B, et al. (2013) Divergent Expression Regulation of Gonad Development Genes in Medaka Shows Incomplete Conservation of the Downstream Regulatory Network of Vertebrate Sex Determination. *Mol Biol Evo*.30(10):2328-2346. doi:10.1093/molbev/mst130.
- Herrera F, Martín V, Garcia-Santos G, Rodríguez-Blanco J, Antolin I, Rodríguez C (2007) Melatonin prevents glutamate-induced oxytosis in the HT22 mouse hippocampal cell line through an antioxidant effect specifically targeting mitochondria. *J Neurochem*. 100, 736–746. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04228.x
- Hobaek A, Larsson P (1990) Sex Determination in *Daphnia Magna*. *Ecol*. 71,6:2255-2268. doi:10.2307/1938637
- Holleley CE, O'Meally D, Sarre S, Marshall Graves JA, Ezaz T, Matsubara K, Azad B, Zhang X, Georges A (2015) Sex reversal triggers the rapid transition from genetic to temperature-dependent sex. *Nat*. 523, 79–82. doi:10.1038/nature14574
- Huang TS, Ruoff P, Fjelldal PG (2010) Effect of continuous light on daily levels of plasma melatonin and cortisol and expression of clock genes in pineal gland, brain, and liver in atlantic salmon postsmolts. *Chronobiol Int*. 27; 9-10. doi: 10.3109/07420528.2010.521272
- Huang QS, Dong SJ, Fang C, Wu XL, Ye T, Lin Y (2012) Deep sequencing-based transcriptome profiling analysis of *Oryzias melastigma* exposed to PFOS. *Aquat Toxicol*. 120:54–58. doi: 10.1016/j.aquatox.2012.04.013
- Ijiri S, Kaneko H, Kobayashi T, Wang DS, Sakai F, Paul-Prasanth B, Nakamura M, Nagahama Y (2008) Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. *Biol Reprod*. 78:333-341. doi: 10.1095/biolreprod.107.064246
- Imsland AK, Foss A, Koedijk R, Folkvord A, Stefansson SO, Jonassen TM (2007) Persistent growth effects of temperature and photoperiod in Atlantic cod *Gadus morhua*. *J Fish Biol*. 71: 1371–1382. doi:10.1111/j.1095-8649.2007.01600.x
- Inoue H and Nishida E (2010) The DM Domain Transcription Factor MAB-3 Regulates Male Hypersensitivity to Oxidative Stress in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Biol*. 30(14):3453-3459. doi:10.1128/MCB.01459-09.
- Iwata E, Mikami K, Manbo J, Moriya-Ito K, Sasaki H (2012) Social interaction influences blood cortisol values and brain aromatase genes in the protandrous false clown anemonefish, *Amphiprion ocellaris*. *Zool Sci*. 29. 849–855. Doi: 10.2108/zsj.29.849
- Jin Y, Chen R, Liu W, Fu Z (2010) Effect of endocrine disrupting chemicals on the transcription of genes related to the innate immune system in the early developmental stage of zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Shellfish Immunol*. 28:854–861. doi: 10.1016/j.fsi.2010.02.009
- Jin J, Wang Y, Wu Z, Hergazy A, Lan J, Zhao L, Liu X, Chen N, Lin L (2017) Transcriptomic analysis of liver from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) exposed to high environmental ammonia reveals the activation of antioxidant and apoptosis pathways. *Fish Shell Immunol*, 63,444-451. doi:10.1016/j.fsi.2017.02.037
- Johnson NS, Swink WD, Brenden TO (2017) Field study suggests that sex determination in sea lamprey is directly influenced by larval growth rate. *Proc Biol Sci*. Mar 29;284(1851). doi: 10.1098/rspb.2017.0262.



- Jung SJ, Choi YJ, Kim NN, Choi JY, Kim BS, Choi CY (2016) Effects of melatonin injection or green-wavelength LED light on the antioxidant system in goldfish (*Carassius auratus*) during thermal stress. *Fish shellfish immun.* 52, 157-166. doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.002
- Kamiya T, Kai W, Tasumi S, Oka A, Matsunaga T, Mizuno N, Fujita M, Suetake H, Suzuki, S, Hosoya S, Tohari S, Brenner S, Miyadai T, Venkatesh B, Suzuki Y, Kikuchi K (2012) A trans-species missense SNP in *Amhr2* is associated with sex determination in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes* (fugu). *PLoS Genetics* 8:e100279. doi:10.1371/journal.pgen.1002798
- Karube M, Fernandino JI, Strobl-Mazzulla PH, Strüssmann CA, Yoshizaki G, et al. (2007) Characterization and expression profile of the ovarian cytochrome p-450 aromatase (*cyp19A1*) gene during the thermolabile sex determination period in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 307: 625–636. doi:10.1002/jez.416
- Kasahara E, Sekiyama A, Hori M, Kuratsune D, Fujisawa N, Chida D, Hiramoto HLi J, Okamura HInoue M, Kitagawa S (2015) Stress-Induced Glucocorticoid Release Upregulates Uncoupling Protein-2 Expression and Enhances Resistance to Endotoxin-Induced Lethality. *Neuroimmunomodul.* 22:279-292. doi:10.1159/000368802
- Kesarwani P, Murali AK, Al-Khami AA, Mehrotra S (2013) Redox Regulation of T-Cell Function: From Molecular Mechanisms to Significance in Human Health and Disease *Antioxid Redox Signal.* 18(12): 1497–1534. doi: 10.1089/ars.2011.4073
- Kikuchi Y, Hosono K, Yamashita J, Kawabata Y, Okubo K (2015) Glucocorticoid receptor exhibits sexually dimorphic expression in the medaka brain. *Gen Comp Endocrinol.* 223:47-53. doi: 10.1016/j.ygcen.2015.09.031
- Kim NN, Choi YJ, Shin HS, et al. (2014) The effect of LED light spectra on antioxidant system by thermal stress in goldfish, *Carassius auratus* *Mol. Cell. Toxicol.* 10: 47. doi:10.1007/s13273-014-0006-y
- Kim BS, Jin SJ, Choi YJ, Kim NN, Choi CY, Kim JW (2016) Effects of different light wavelengths from LEDs on oxidative stress and apoptosis in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) at high water temperatures. *Fish shellfish immun* 55: 460-468. doi:10.1016/j.fsi.2016.06.021
- Kim JH, Park HJ, Kim KW, et al. (2017) Growth performance, oxidative stress, and non-specific immune responses in juvenile sablefish, *Anoplopoma fimbria*, by changes of water temperature and salinity. *Fish Physiol Biochem* pp 1–11. doi:10.1007/s10695-017-0382-z
- Krauss S, Zhang CY, Lowell BB (2005) The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6(3):248-61. doi: 10.1038/nrm1572
- Krstić J, Trivanović D, Mojsilović S, Santibanez JF (2015) "Transforming Growth Factor-Beta and Oxidative Stress Interplay: Implications in Tumorigenesis and Cancer Progression," *Oxi Med Cell Long.* 654594,15, 2015. doi:10.1155/2015/654594
- Kukat A, Dogan SA, Edgar D, Mourier A, Jacoby C, Maiti P, et al. (2014) Loss of UCP2 Attenuates Mitochondrial Dysfunction without Altering ROS Production and Uncoupling Activity. *PLoS Genet* 10(6): e1004385. doi:10.1371/journal.pgen.1004385
- Lasala C, Scheingart HF, Arouche N, Bedecarras P, Grinspon RP, Picard JY, Josso N, di Clemente N, Rey RA (2011) SOX9 and SF1 are involved in cyclic AMP-mediated upregulation of anti-Müllerian gene expression in the testicular prepubertal Sertoli cell line SMAT1. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 301: E539-E547. doi: 10.1152/ajpendo.00187.2011
- Lascaratos G, Ji D, Wood JPM, Osborne NN (2007) Visible light affects mitochondrial function and induces neuronal death in retinal cell cultures. *Vis Res.* 47,9,1191–1201. doi:10.1016/j.visres.2006.12.014
- Ledesma A, Lacoba MG, Rial E (2002) The mitochondrial uncoupling proteins. *Genome Biol.* 3(12):reviews3015.1-reviews3015.9
- Lee K H, Yamaguchi A, Rashid H, Kadomura K, Yasumoto S, Matsuyama M (2009) Germ cell degeneration in high-temperature treated pufferfish *Takifugu rubripes*. *Sex. Dev.* 3, 225–232. doi:10.1159/000228723
- Lees A D (1990) Dual photoperiodic timers controlling sex and female morph determination in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *J Insect Physiol.* 36,8:585–591. doi:10.1016/0022-1910(90)90027-D
- Li M, Sun Y, Zhao J, Shi H, Zeng S, Ye K, et al. (2015) A Tandem Duplicate of Anti-Müllerian Hormone with a Missense SNP on the Y Chromosome Is Essential for Male Sex Determination in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *PLoS Genet* 11(11): e1005678. doi:10.1371/journal.pgen.1005678
- Librán-Pérez M, López-Patiño MA, Míguez JM, Soengas JL (2013) Oleic Acid and Octanoic Acid Sensing Capacity in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* Is Direct in Hypothalamus and Brockmann Bodies. *PLoS ONE* 8(3): e59507. doi.10.1371/journal.pone.0059507



- Liew WC, Bartfai R, Lim ZJ, Sreenivasan R, Siegfried KR, Orban L (2012) Polygenic sex determination system in zebrafish. PLoS ONE 7:e34397. doi: 10.1371/journal.pone.0034397
- Lismont C, Nordgren M, Brees C, Knoop B, Van Veldhoven PP, Fransen M (2017) Peroxisomes as modulators of cellular protein thiol oxidation: a new model system. Antioxid Redox Signal. doi: 10.1089/ars.2017.6997
- Liu Y, Wang J, Wei Y, Zhang H, Xu M, Dai J (2008) Induction of time-dependent oxidative stress and related transcriptional effects of perfluorododecanoic acid in zebrafish liver. Aquatic Toxicol. 89:242–250. doi: 10.1016/j.aquatox.2008.07.009
- Liu R-M and Desai LP (2015) Reciprocal regulation of TGF- $\beta$  and reactive oxygen species: A perverse cycle for fibrosis. Redox Biol.6:565-577. doi:10.1016/j.redox.2015.09.009.
- Liu Y, Li X, Xu GF, Bai SY, Zhang YQ, Gu W, Mou ZB (2015) Effect of photoperiod manipulation on the growth performance of juvenile lenok, *Brachymystax lenok* (Pallas, 1773). J Appl Ichthyol. 31: 120–124. doi: 10.1111/jai.12632
- Liu H, Todd EV, Lokman PM, Lamm MS, Godwin JR, Gemmell NJ (2017) Sexual plasticity: A fishy tale. Mol. Reprod. Dev., 84: 171–194. doi:10.1002/mrd.22691
- López-Olmeda JF, Montoya A, Oliveira C, Sánchez-Vázquez FJ (2009) Synchronization to light and restricted-feeding schedules of behavioral and humoral daily rhythms in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Chronobiol Int. 26:1389–1408. doi: 10.3109/07420520903421922.
- Lupien SJ, Maheu F, Tu M, Fiocco A, and Schramek TE (2007) The effects of stress and stress hormones on human cognition: implications for the field of brain and cognition. Brain Cogn. 65: 209–237, 2007. doi: 10.1016/j.bandc.2007.02.007
- Lushchak VI (2011) Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. Aquat Toxicol 101:13–30. doi: 10.1016/j.aquatox.2010.10.006
- Luzio A, Matos M, Santos D, Fontainhas-Fernandes AA, Monteiro SM, Coimbra AM (2016) Disruption of apoptosis pathways involved in zebrafish gonad differentiation by 17 $\alpha$ -ethinylestradiol and fadrozole exposures. Aquat Toxicol. 177:269-84. doi: 10.1016/j.aquatox.2016.05.029.
- Ma M, Chen X-Y, Gu C, Xiao X-R, Guo T, Li B (2014) Biochemical changes of oxidative stress in premature ovarian insufficiency induced by tripterygium glycosides. Int J Clin Exp Pathol. 7(12):8855-8861. PMC4313959
- Ma Z, Zheng P, Guo H, Jiang S, Qin JG, Zhang D, Liu X (2016) Salinity regulates antioxidant enzyme and Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup>-ATPase activities of juvenile golden pompano *Trachinotus ovatus* (Linnaeus 1758). Aquac Res. 47:1481–1487. doi:10.1111/are.12606
- Ma M, Chen X-Y, Li B, Li X-T (2017) Melatonin protects premature ovarian insufficiency induced by tripterygium glycosides: role of SIRT1. Am J Trans Res. 9(4):1580-1602. PMC5411910
- Mai WJ, Yan J, Wang L, Zheng Y, Xin Y, Wang W (2010) Acute acidic exposure induces p53-mediated oxidative stress and DNA damage in tilapia (*Oreochromis niloticus*) blood cells. Aquat. Toxicol. 100; 271–281. doi: 10.1016/j.aquatox.2010.07.025
- Maitra SK and Hasan KN (2016) The Role of Melatonin as a Hormone and an Antioxidant in the Control of Fish Reproduction. Front Endocrinol. 7:38. doi: 10.3389/fendo.2016.00038
- Mark FC, Lucassen M, Pörtner HO (2006) Thermal sensitivity of uncoupling protein expression in polar and temperate fish. Comp Biochem Physiol Part D Gen Prot. 1(3):365-74. doi: 10.1016/j.cbd.2006.08.004
- Martín-Robles AJ, Aliaga-Guerrero M, Whitmore D, Pendón C, Muñoz-Cueto JA (2012) The circadian clock machinery during early development of Senegalese sole (*Solea senegalensis*): effects of constant light and dark conditions. Chronobiol Int. 29(9):1195-205. doi: 10.3109/07420528.2012.719963
- Martínez P, Viñas AM, Sánchez L, Díaz N, Ribas L, Piferrer F (2014) Genetic architecture of sex determination in fish: applications to sex ratio control in aquaculture. Front Genet. 5:340. doi: 10.3389/fgene.2014.00340
- Martínez-Chávez CC, Tello-Ballinas A, Fonseca-Madrigal J, Ross LG and Martínez-Palacios CA (2014) Photoperiodic growth enhancement in a tropical batch spawning atherinopsid, pike silverside *Chirostoma estor*. J Fish Biol. 85: 546–553. doi: 10.1111/jfb.12442
- Martínez-Palacios CA, Comas-Morte J, Tello-Ballinas JA, Toledo-Cuevas M, Ross LG (2004) The effects of saline environments on survival and growth of eggs and larvae of *Chirostoma estor* Jordan 1880 (Pisces: Atherinidae). Aqua. 238:509-522. doi:10.1016/j.aquaculture.2003.10.032



- Martínez-Palacios CA, Racotta IS, Ríos-Duran MG, Palacios E, Toledo-Cuevas M, Ross LG (2006) Advances in applied research for the culture of Mexican silversides (*Chirostoma*, Atherinopsidae). *Biocell*. 30:137-148
- Martínez-Palacios CA, Chávez-Sosa JC, Santoyo-Guzmán VO, Campos-Mendoza A, Martínez-Chavez CC, Ross LG (2007) The effect of photoperiod on the reproduction of *Chirostoma estor* Jordan 1879 from Lago de Pátzcuaro, Mexico. *J Appl Ichthyol*. doi: 10.1111/j.1439-0426.2007.00856.x
- Martins RST, Gomez A, Zanuy S, Carrillo M, Canario AVM (2015) Photoperiodic Modulation of Circadian Clock and Reproductive Axis Gene Expression in the Pre-Pubertal European Sea Bass Brain. *PLoS ONE* 10(12): e0144158. doi:10.1371/journal.pone.0144158
- Martyniuk CJ and Denslow ND (2012) Exploring Androgen-Regulated Pathways in Teleost Fish Using Transcriptomics and Proteomics. *Int Comp Biol*. 52(5):695-704. doi:10.1093/icb/ics072
- Mata-Sotres JA, Martínez-Rodríguez G, Pérez-Sánchez J, Sánchez-Vázquez FJ, Yúfera M (2015) Daily rhythms of clock gene expression and feeding behavior during the larval development in gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Chronobiol Int*. 32(8):1061-74 doi: 10.3109/07420528.2015.1058271
- Mata-Sotres JA, Moyano FJ, Martínez-Rodríguez G, Yúfera M (2016) Daily rhythms of digestive enzyme activity and gene expression in gilthead seabream (*Sparus aurata*) during ontogeny. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 197:43-51. doi: 10.1016/j.cbpa.2016.03.010
- Mei J and Gui JF (2015) Genetic basis and biotechnological manipulation of sexual dimorphism and sex determination in fish. *Sci China Life Sci*. 58(2):124-36. doi: 10.1007/s11427-014-4797-9
- Melo MC, Andersson E, Fjellidal PG, Bogerd J, França LR, Taranger GL, Schulz RW (2014) Salinity and photoperiod modulate pubertal development in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J Endocrinol*. 220 (3) 319-332. doi: 10.1530/JOE-13-0240
- Merchant-Larios H, Díaz-Hernández V (2013) Environmental Sex Determination Mechanisms in Reptiles. *Sex Dev*. 7:95-103 doi: 10.1159/000341936
- Metcalfe NB and Alonso-Alvarez C (2010) Oxidative stress as a life-history constraint: the role of reactive oxygen species in shaping phenotypes from conception to death. *Fun Ecol*. 24: 984–996. doi:10.1111/j.1365-2435.2010.01750.x
- Migaud H, Davie A. and Taylor JF (2010) Current knowledge on the photoneuroendocrine regulation of reproduction in temperate fish species. *J Fish Biol*. 76: 27–68. doi:10.1111/j.1095-8649.2009.02500.x
- Monaghan P, Metcalfe NB, Torres R (2009) Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecol Lett*. 12:1, 75-92. doi:10.1111/j.1461-0248.2008.01258.x
- Myosho T, Otake H, Masuyama H, Matsuda M, Kuroki Y, Fujiyama A, Naruse K, Hamaguchi S, Sakaizumi M (2012) Tracing the emergence of a novel sex-determining gene in medaka, *Oryzias luzonensis*. *Genet*. 191:163-170. doi: 10.1534/genetics.111.137497
- Myosho T, Takehana Y, Hamaguchi S, Sakaizumi M (2015) Turnover of Sex Chromosomes in Celebensis Group Medaka Fishes. *G3*. 5-12: 2685-2691. doi: 10.1534/g3.115.021543
- Nagasawa K, Giannetto A, Fernandes JMO (2012) Photoperiod Influences Growth and mll (Mixed-Lineage Leukaemia) Expression in Atlantic Cod. *PLoS ONE* 7(5): e36908. doi:10.1371/journal.pone.0036908
- Nakamura M (2009) Sex determination in amphibians. *Sem Cell & Develop Biol*. 20:3, 271-282. doi.org/10.1016/j.semcdb.2008.10.003
- Nakamura S, Kurokawa H, Asakawa S, Shimizu N, Tanaka M (2009) Two distinct types of theca cells in the medaka gonad: germ cell-dependent maintenance of *cyp19a1*-expressing theca cells. *Dev.Dyn*. 238, 2652–2657. doi:10.1002/dvdy.22068
- Nardocci G, Navarro C, Cortés PP, Imarai M, Montoya M, Valenzuela B, Jara P, Acuña-Castillo C, Fernández R (2014) Neuroendocrine mechanisms for immune system regulation during stress in fish. *Fish Shellfish Immunol*. 40(2):531-8. doi: 10.1016/j.fsi.2014.08.001
- Navarro-Martín L, Viñas J, Ribas L, Díaz N, Gutiérrez A, DiCroce L, et al. (2011) DNA methylation of the gonadal aromatase (*cyp19a*) promoter is involved in temperature-dependent sex ratio shifts in the European sea bass. *PLoSGenet*. 7:e1002447. doi:10.1371/journal.pgen.1002447
- Naylor C, Adams J, Greenwood PJ (1988<sup>a</sup>) Variation in sex determination in natural populations of a shrimp. *J Evol Biol*. 1:355–368. doi: 10.1046/j.1420-9101.1988.1040355.x
- Naylor C, Adams J, Greenwood PJ (1988<sup>b</sup>) Population dynamics and adaptive sexual strategies in a brackish water



- crustacean, *Gammarus duebeni*. *J Anim Ecol.* 57:493–507. doi: 10.2307/4920
- Nef S and Vassalli JD (2009) Complementary pathways in mammalian female sex determination. *J. Biol.* 8:74. doi:10.1186/jbiol173
- Nesan D and Vijayan MM (2012) Embryo exposure to elevated cortisol level leads to cardiac performance dysfunction in zebrafish. *Mol Cell Endocrinol.* 363(1-2):85-91. doi: 10.1016/j.mce.2012.07.010
- Nishimura T and Tanaka M (2014) Gonadal Development in Fish. *Sex Dev.* 8:252-261. doi:10.1159/000364924
- Oliveira CCV, Aparicio R, Blanco-Vives B, Chereguini O, Martín I, Sánchez-Vázquez FJ (2013) Endocrine (plasma cortisol and glucose) and behavioral (locomotor and self-feeding activity) circadian rhythms in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858) exposed to light/dark cycles or constant light. *Fish Physiol Biochem.* 39:479–487. doi:10.1007/s10695-012-9713-2
- Olsvik PA, Vikeså V, Lie KK, Hevrøy EM (2013) Transcriptional responses to temperature and low oxygen stress in Atlantic salmon studied with next-generation sequencing technology. *BMC Geno.*14(1):817. doi:10.1186/1471-2164-14-817
- Ospina-Alvarez N and Piferrer F (2008) Temperature-dependent sex determination in fish revisited: prevalence, a single sex ratio response pattern, and possible effects of climate change. *PLoS One* 3, 11. doi: 10.1371/journal.pone.0002837
- Otero-Rodiño C, Librán-Pérez M, Velasco C, López-Patiño MA, Míguez JM, Soengas JL (2015) Evidence for the Presence of Glucosensor Mechanisms Not Dependent on Glucokinase in Hypothalamus and Hindbrain of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Planas JV, ed. *PLoS ONE.* 10(5):e0128603. doi:10.1371/journal.pone.0128603
- Pacitti D, Wang T, Page MM, Martin SA, Sweetman J, Feldmann J, Secombes CJ (2013) Characterization of cytosolic glutathione peroxidase and phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their modulation by in vitro selenium exposure. *Aquat Toxicol.* 130-131:97-111. doi: 10.1016/j.aquatox.2012.12.020
- Pan Q, Anderson J, Bertho S, Herpin A, Wilson C, Postlethwait JH, Schartl M, Guiguen Y (2016) Vertebrate sex-determining genes play musical chairs. *Comptes Rendus Biol.* 1631-0691. doi:10.1016/j.crv.2016.05.010
- Penman DJ and Piferrer F (2008) Fish gonadogenesis. Part1: Genetic and environmental mechanisms of sex determination. *Rev Fish Sci.* 16(S1): 16-34. doi:10.1080/10641260802324610
- Pezaro N, Doody JS, Thompson MB (2016) The ecology and evolution of temperature-dependent reaction norms for sex determination in reptiles: a mechanistic conceptual model. *Biol Rev.* 1469-185. doi:10.1111/brv.12285
- Pittman K, Yúfera M, Pavlidis M, Geffen AJ, Koven W, Ribeiro L, Zambonino-Infante JL, Tandler A (2013) Fantastically plastic: fish larvae equipped for a new world. *Rev Aqua.* 5: S224–S267. doi: 10.1111/raq.12034
- Politis SN, Butts IAE, Tomkiewicz J (2014) Light impacts embryonic and early larval development of the European eel, *J. Exp Mar Biol Ecol.* 461,407-415. doi:10.1016/j.jembe.2014.09.014
- Purushothaman S, Saxena S, Meghah V, Meena Lakshmi MG, Singh SK, Brahmendra Swamy CV, Idris MM (2015) Proteomic and gene expression analysis of zebrafish brain undergoing continuous light/dark stress. *J Sleep Res.* 24(4):458-65. doi: 10.1111/jsr.12287
- Rahman MS and Thomas P (2015) Molecular characterization and hypoxia-induced upregulation of neuronal nitric oxide synthase in Atlantic croaker: Reversal by antioxidant and estrogen treatments. *Comp Biochem and Phys Part A: Mol & Int Phys.*185, 91-106. doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.03.013
- Rajakumar A and Senthilkumaran B (2016) Sox3 binds to 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase gene promoter suggesting transcriptional interaction in catfish. *J Steroid Biochem Mol Biol.* S0960-0760(16)30003-6. doi: 10.1016/j.jsbmb.2016.01.003
- Ramanathan L, Gulyani S, Nienhuis R, Siegel JM (2002) Sleep deprivation decreases superoxide dismutase activity in rat hippocampus and brainstem. *NeuroReport.* 13: 1387–1390. doi: 10.1097/00001756-200208070-00007
- Ramírez-Duarte WF, Jin J, Kurobe T, Teh SW (2016) Effects of prolonged exposure to low pH on enzymatic and non-enzymatic antioxidants in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*). *Sci Total Env.* 568, 26-32. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.05.179.
- Ramírez-Duarte WF, Kurobe T, Teh SJ (2017) Effects of low levels of ultraviolet radiation on antioxidant mechanisms of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*), *Chemos.* 181,304-312. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.04.078
- Ray S and Reddy AB (2016) Cross-talk between circadian clocks, sleep-wake cycles, and metabolic networks: Dispelling the darkness, *Bioessays;* 38(4):394-405. doi:10.1002/bies.201500056



- Ribas L, Liew WC, Díaz N, Sreenivasan R, Orbán L, Piferrer F (2017) Heat-induced masculinization in domesticated zebrafish is family-specific and yields a set of different gonadal transcriptomes. *PNAS*. 114 (6) E941-E950. doi:10.1073/pnas.1609411114
- Roberts TC, Coenen-Stass AM, Betts CA, Wood MJ (2014) Detection and quantification of extracellular microRNAs in murine biofluids. *Biol Proced Online*.14;16(1):5. doi: 10.1186/1480-9222-16-5
- Roberts NB, Juntti SA, Coyle KP, et al. (2016) Polygenic sex determination in the cichlid fish *Astatotilapia burtoni*. *BMC Genomics*. 17:835. doi:10.1186/s12864-016-3177-1.
- Roco AS, Olmstead AW, Degitz SJ, Amano T, Zimmerman LB, Bullejos M (2015) Coexistence of Y, W, and Z sex chromosomes in *Xenopus tropicalis*. *PNAS*. 112 (34) E4752-E4761. doi:10.1073/pnas.1505291112
- Rodríguez-Mari A, Yan YL, Bremiller RA, Wilson C, Canestro C, Postlethwait JH (2005) Characterization and expression pattern of zebrafish Anti-Mullerian hormone (Amh) relative to *sox9a*, *sox9b*, and *cyp19a1a*, during gonad development. *Gene Expr Patterns*. 5:655–667. doi: 10.1016/j.modgep.2005.02.008
- Rodríguez-Marí A, Cañestro C, BreMiller RA, Nguyen-Johnson A, Asakawa K, et al. (2010) Sex Reversal in Zebrafish fancl Mutants Is Caused by Tp53- Mediated Germ Cell Apoptosis. *PLoS Genet* 6(7): e1001034. doi:10.1371/journal.pgen.1001034
- Ross JA, Urton JR, Boland J, Shapirom MD, Peichel CL (2009) Turnover of sex chromosomes in the stickleback fishes (gasterosteidae). *PLoS Genet*. 5: e1000391. doi: 10.1371/journal.pgen.1000391
- Rubin DA (1985) Effect of pH on sex ratio in cichlids and a poeciliid (Teleostei). *Cop*. 1985, 233–235. doi: 10.2307/1444818
- Saleh DO and Mansour DF (2016). Ovario-protective effects of genistein against cyclophosphamide toxicity in rats: Role of anti-müllerian hormone and oestradiol. *Eur J Pharmacol*. 789:163-71. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.07.026
- Schiavone S, Jaquet V, Trabace L, Krause KH (2013) Severe Life Stress and Oxidative Stress in the Brain: From Animal Models to Human Pathology. *Antiox & Redox Signal*. 18(12) doi: 10.1089/ars.2012.4720
- Schultheis C, Böhne A, Scharf M, Voff JN, Galiana-Arnoux D (2009) Sex determination diversity and sex chromosome evolution in poeciliid fish. *Sex Dev*. 3, 68–77. doi:10.1159/000223072
- Schuppe ER, Solomon-Lane TK, Pradhan DS, Thonkulpitak K, Grober MS (2016) Ancestral androgenic differentiation pathways are repurposed during the evolution of adult sexual plasticity. *Evol & Develop*. 18: 285–296. doi:10.1111/ede.12207
- Schwanz LE, Ezaz T, Gruber B, Georges A (2013) Novel evolutionary pathways of sex-determining mechanisms. *J Evol Biol*. 26: 2544–2557. doi: 10.1111/jeb.12258
- Shen ZG and Wang HP (2014) Molecular players involved in temperature-dependent sex determination and sex differentiation in Teleost fish. *Gen, Select, Evol: GSE*, 46(1), 26. doi:10.1186/1297-9686-46-26
- Shen ZG, Wang HP, Yao H, O'Bryant P, Rapp D, Zhu KQ (2016) Sex Determination in Bluegill Sunfish *Lepomis macrochirus*: Effect of Temperature on Sex Ratio of Four Geographic Strains. *Biol Bull*. 230(3):197-208. doi: 10.1086/BBLv230n3p197
- Shoemaker C and Crews D (2009) Analyzing the coordinated gene network underlying temperature-dependent sex determination in reptiles. *Sem. Cell Dev. Biol*. 20, 292–303. doi:10.1016/j.semcdb.2008.10.010
- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Love-Badge R, Goodfellow PN (1990) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nat*. 346:240–244. doi:10.1038/346240a0
- Sinha AK, AbdElgawad H, Giblen T, et al.(2014) Anti-Oxidative Defences Are Modulated Differentially in Three Freshwater Teleosts in Response to Ammonia-Induced Oxidative Stress. *Prunet P, ed. PLoS ONE*. 9(4):e95319. doi:10.1371/journal.pone.0095319
- Smith CA, Roeszler KN, Ohnesorg T, Cummins DM, Farlie PG, Doran TJ, Sinclair AH (2009) The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. *Nat*. 461: 267–271. doi: 10.1038/nature08298
- Sopinka NM, Patterson LD, Redfern JC, Pleizier NK, Belanger CB, Midwood JD, Crossin GT, Cooke SJ (2015) Manipulating glucocorticoids in wild animals: basic and applied perspectives. *Conserv Physiol*. 3 (1): cov031. doi: 10.1093/conphys/cov031
- Sovrano VA, Bertolucci C, Frigato E, Foà A, Rogers LJ (2016) Influence of exposure in ovo to different light wavelengths on the lateralization of social response in zebrafish larvae. *Physiol Behav*. 157:258-64. doi:



10.1016/j.physbeh.2016.02.016

- Speakman JR, Blount JD, Bronikowski AM, Buffenstein R, Isaksson C, Kirkwood TBL, Monaghan P, et al. (2015). Oxidative stress and life histories: unresolved issues and current needs. *Ecol Evol.* 5, 5745-5757. doi: 10.1002/ece3.1790
- Strüssmann CA and Nakamura M (2002) Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish Physiol Biochem.* 26: 13–29.7. doi:10.1023/A:1023343023556
- Strüssmann CA, Conover DO, Somoza GM, Miranda LA (2010) Implications of climate change for the reproductive capacity and survival of new world silversides (family Atherinopsidae). *J Fish Biol.* 77:1818-1834. doi: 10.1111/j.1095-8649.2010.02780.x
- Stuart JA, Harper JA, Brindle KM, Brand MD (1999) Uncoupling protein 2 from carp and zebrafish, ectothermic vertebrates. *Biochim Biophys Acta.* 1413(1):50-4. doi:10.1016/S0005-2728(99)00081-X
- Sun H, Wang W, Li J, Yang Z (2014) Growth, oxidative stress responses, and gene transcription of juvenile bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) under chronic-term exposure of ammonia. *Environ Toxicol Chem.* 33(8):1726-31. doi:10.1002/etc.2613.
- Takahashi A, Kasagi S, Murakami N, Furufuji S, Kikuchi S, Mizusawa K, Andoh T (2016) Chronic effects of light irradiated from LED on the growth performance and endocrine properties of barfin flounder *Verasper moseri*. *Gen Comp Endo.* 232:101-108. doi:10.1016/j.ygcen.2016.01.008
- Takehana Y, Naruse K, Hamaguchi S & Sakaizumi M (2007) Evolution of ZZ/ZW and XX/XY sex-determination systems in the closely related medaka species, *Oryzias hubbsi* and *O. dancena*. *Chrom.* 116, 463–470. doi: 10.1007/s00412-007-0110-z
- Takehana Y, Matsuda M, Myosho T, Suster ML, Kawakami K, et al. (2014) Co-option of Sox3 as the male-determining factor on the Y chromosome in the fish *Oryzias dancena*. *Nat Commun.* 5: 4157. doi: 10.1038/ncomms5157
- Tang Z, Sun C, Yan A, Wu S, Qin C, Zhang Y, Li W (2013) Genes involved in fatty acid metabolism: molecular characterization and hypothalamic mRNA response to energy status and neuropeptide Y treatment in the orange-spotted grouper *Epinephelus coioides*. *Mol Cell Endocrinol.* 25;376(1-2):114-24. doi: 10.1016/j.mce.2013.06.020
- Thilagam H, Gopalakrishnan S, Qu HD. et al. (2010) 17 $\beta$  estradiol induced ROS generation, DNA damage and enzymatic responses in the hepatic tissue of Japanese sea bass. *Ecotox.* 19: 1258. doi:10.1007/s10646-010-0510-3
- Thilagam H, Gopalakrishnan S, Bo J, Wang KJ (2014) Comparative study of 17  $\beta$ -estradiol on endocrine disruption and biotransformation in fingerlings and juveniles of Japanese sea bass *Lateolabrax japonicus*, *Mar Poll Bull.* 85: 2, 30: 332-337. doi: 10.1016/j.marpolbul.2014.05.024
- Tian HY, Zhang DD, Xu C, Wang F, Liu WB (2015) Effects of light intensity on growth, immune responses, antioxidant capability and disease resistance of juvenile blunt snout bream *Megalobrama amblycephala*, *Fish Shell Immuno.* 47,2, 674-680. doi:10.1016/j.fsi.2015.08.022
- Tiedke J, Cubuk C, Burmester T (2013) Environmental acidification triggers oxidative stress and enhances globin expression in zebrafish gills *Biochem Biophys Res Commun.* 22;441(3):624-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.10.104
- Tine M, Kuhl H, Jastroch M, Reinhardt R (2012) Genomic characterization of the European sea bass *Dicentrarchus labrax* reveals the presence of a novel uncoupling protein (UCP) gene family member in the teleost fish lineage. *BMC Evol Biol.* 12:62. doi:10.1186/1471-2148-12-62
- Toda C and Diano S (2014) Mitochondrial UCP2 in the central regulation of metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 28(5):757-64. doi: 10.1016/j.beem.2014.02.006
- Tokarz J, Möller G, D' Angelis HM, Adamski J (2015) Steroids in teleost fishes: A functional point of view. *Steroids.* 103,123-144. doi:10.1016/j.steroids.2015.06.011
- Tsalafouta A, Papandroulakis N, Gorissen M, Katharios P, Flik G, Pavlidis M (2014) Ontogenesis of the HPI axis and molecular regulation of the cortisol stress response during early development in *Dicentrarchus labrax*. *Sci Rep.* 4:5525. doi:10.1038/srep05525
- Valenzuela N, Adams DC, Janzen FJ (2003) Pattern does not equal process: Exactly when is sex environmentally determined?. *Amer Nat.* 161:676–683. doi:10.1086/368292
- Vandeputte M, Dupont-Nivet M, Chavanne H, Chatain B (2007) A poly-genic hypothesis for sex determination in the European seabass *Dicentrarchus labrax*. *Genet.* 176, 1049–1057. doi:10.1534/genetics.107.072140
- Vera LM, Montoya A, Pujante IM, Pérez-Sánchez J, Caldusch-Giner JA, Mancera JM, Moliner J, Sánchez-Vázquez FJ (2014) Acute stress response in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) is time-of-day dependent: Physiological and



- oxidative stress indicators. *Chronobiol Int.* 31(9):1051-61. doi: 10.3109/07420528.2014.945646
- Veras GC, Brabo MF, Dias JA, Abe HA, Nunes ZMP, Murgas LDS (2016) The effect of photoperiod and feeding frequency on larval of the Amazonian ornamental fish *Pyrhulina brevis* (Steindachner, 1876). *Aqua Res.* 47: 797–803. doi: 10.1111/are.12538
- Villamizar N, Blanco-Vives B, Migaud H, Davie A, Carboni S, Sánchez-Vázquez FJ (2011) Effects of light during early larval development of some aquacultured teleosts: A review. *Aqua.* 315,1, 86-94. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.10.036.
- Villamizar N, Vera LM, Foulkes NS, Sánchez-Vázquez FJ (2014) Effect of lighting conditions on zebrafish growth and development. *Zebrafish.* 11(2):173-181. doi:10.1089/zeb.2013.0926
- Vinagre C, Madeira D, Narciso L, Cabral HN, Diniz M (2012) Effect of temperature on oxidative stress in fish: lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Ecol Indic.* 23:274–279. doi: 10.1016/j.ecolind.2012.04.009
- Vitagliano E, Marchetti E, Vitagliano G (1996) Skewed Sex-Ratio, Monogeny, and Maternal Sex Determination in Two Geographical Populations of *Asellus Aquaticus* (L., 1758) (Isopoda). *Crustac.* 69-4: 455 – 475. doi:10.1163/156854096X01041
- Vizziano D, Randuineau G, Baron D, Cauty C, Guiguen Y (2007) Characterization of early molecular sex differentiation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Dev Dyn.* 236:2198-2206. doi: 10.1002/dvdy.21212
- Vizziano-Cantonnet D, Di Landro S, Lasalle A, Martínez A, Mazzoni TS, Quagio-Grassiotto I (2016) Identification of the molecular sex-differentiation period in the siberian sturgeon. *Mol Reprod Dev.* 83: 19–36. doi:10.1002/mrd.22589
- Volkoff H, Hoskins LJ, Tuziak SM (2010) Influence of intrinsic signals and environmental cues on the endocrine control of feeding in fish: Potential application in aquaculture. *Gen Comp Endo.* 167: 3, 352-359. doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.09.001
- Von Schantz T, Bensch S, Grahn M, Hasselquist D, Wittzell H (1999) Good genes, oxidative stress and condition-dependent sexual signals. *Proc. R. Soc. Lond. B* 266, 1–1210.1098/rspb.1999.0597. doi: 10.1098/rspb.1999.0597
- Vozza A, Parisi G, De Leonardis F, Lasorsa F M, Castegna A, Amorese D, et al. (2014) UCP2 transports C4 metabolites out of mitochondria, regulating glucose and glutamine oxidation. *PNAS.* 111, 960–965. doi:10.1073/pnas.1317400111
- Walker G (2005) Sex determination in the larvae of the parasitic barnacle *Heterosaccus lunatus*: an experimental approach. *J Exp Mar Biol Ecol.* 318:31–38. doi:10.1016/j.jembe.2004.12.008
- Wang DS, Kobayashi T, Zhou LY, Nagahama Y (2004) Molecular cloning and gene expression of *Foxl2* in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Biochem Biophys Res Commun.* 320:83-89. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.05.133
- Wang DS, Kobayashi T, Zhou LY, Paul-Prasanth B, Ijiri S, Sakai F, Okubo K, Morohashi K, Nagahama Y (2007) *Foxl2* up-regulates aromatase gene transcription in a female-specific manner by binding to the promoter as well as interacting with ad4 binding protein/steroidogenic factor 1. *Mol Endocrinol.* 21:712-725. doi: 10.1210/me.2006-0248
- Wang DD, Zhang GR, Wei KJ, Ji W, Gardner JP, Yang RB, Chen KC (2015) Molecular identification and expression of the *Foxl2* gene during gonadal sex differentiation in northern snakehead *Channa argus*. *Fish Physiol Biochem.* 41(6):1419-33. doi: 10.1007/s10695-015-0096-z
- Wang Y, Pati P, Xu Y, Chen F, Stepp DW, Huo Y, et al. (2016) Endotoxin Disrupts Circadian Rhythms in Macrophages via Reactive Oxygen Species. *PLoS ONE* 11(5): e0155075. doi:10.1371/journal.pone.0155075
- Wang QF, Shen WL, Hou CC, Liu C, Wu XF, Zhu JQ. (2017) Physiological responses and changes in gene expression in the large yellow croaker *Larimichthys crocea* following exposure to hypoxia. *Chemo.* 169:418-427. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.11.099.
- Wilking M, Ndiaye M, Mukhtar H, Ahmad N (2013) Circadian rhythm connections to oxidative stress: implications for human health. *Antiox Redox Signal.* 10;19(2):192-208. doi: 10.1089/ars.2012.4889
- Wilson CA, High SK, McCluskey BM, Amores A, Yan YL, et al. (2014) Wild sex in zebrafish: loss of the natural sex determinant in domesticated strains. *Genet.* 198: 1291–1308. doi: 10.1534/genetics.114.169284
- Wilson KS, Tucker CS, Al-Dujaili EAS, et al.(2016) Early-life glucocorticoids programme behaviour and metabolism in adulthood in zebrafish. *J Endo.* 230(1):125-142. doi:10.1530/JOE-15-0376
- Wu GC, Tomy S, Lee MF, Lee YH, Yueh WS, Lin CJ, et al. (2010) Sex Differentiation and sex change in the protandrous black porgy *Acanthopagrus schlegelii*. *Gen Comp Endocrinol.*167,417–421. doi:10.1016/j.ygcen.2009.11.003



- Wu L, Wu F, Xie L, Wang D, Zhou L (2016) Synergistic role of  $\beta$ -catenin1 and 2 in ovarian differentiation and maintenance of female pathway in Nile tilapia, *Mol Cell Endo.* 427, 33-44. doi:10.1016/j.mce.2016.03.002
- Xie F, Xiao P, Chen D, Xu L, Zhang B (2012) miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Mol Biol.* 80 (1), 75-84. doi:10.1007/s11103-012-9885-2
- Yamaguchi T, Yoshinaga N, Yazawa T, Gen K, Kitano T (2010) Cortisol is involved in temperature-dependent sex determination in the Japanese flounder. *Endo.* 151, 3900–3908. doi: 10.1210/en.2010-0228.
- Yamaguchi T and Kitano T (2012) High temperature induces *cyp26b1* mRNA expression and delays meiotic initiation of germ cells by increasing cortisol levels during gonadal sex differentiation in Japanese flounder. *Biochem Biophys Res Commun.* 419, 287–292. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.02.012
- Yamamoto Y, Hattori RS, Kitahara A, Kimura H, Yamashita M, Strüssmann CA (2013) Thermal and Endocrine Regulation of Gonadal Apoptosis during Sex Differentiation in Pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Sex Dev.* 7:316-324. doi: 10.1159/000353506
- Yamamoto Y, Zhang Y, Sarida M, Hattori S, Strussmann CA (2014) Coexistence of genotypic and temperature-dependent sex determination in Pejerrey *Odonthesthes bonariensis*. *PLoS ONE* 9(7):e102574. doi: 10.1371/journal.pone.0102574
- Yang Y-J, Wang Y, Li Z, Zhou L, Gui JF (2017) Sequential, Divergent, and Cooperative Requirements of *Foxl2a* and *Foxl2b* in Ovary Development and Maintenance of Zebrafish. *Gen.* 205,4 1551-1572. doi:10.1534/genetics.116.199133
- Yano A, Nicol B, Guerin A, Guiguen Y (2011) The duplicated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) T-Box transcription factors 1, *tbx1a* and *tbx1b*, are up-regulated during testicular development. *Mol Reprod Dev.* 78:172-180. doi: 10.1002/mrd.21279
- Yano, A, Guyomard, R, Nicol, B, Jouanno, E, Quillet, E, Klopp, C, Cabau, C, Bouchez, O, Fostier, A, Guiguen, Y (2012) An immune-related gene evolved into the master sex-determining gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Curr Biol.* 22:1423-1428. doi: 10.1016/j.cub.2012.05.045
- Yin F, Peng S, Sun P, Shi Z (2011) Effects of low salinity on antioxidant enzymes activities in kidney and muscle of juvenile silver pomfret *Pampus argenteus*. *Acta Ecol Sin.* 31:55–60. doi:10.1016/j.chnaes.2010.11.009
- Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T, Ito M (2008) A W-linked DM-domain gene, *DM-W*, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. *PNAS.* 105:2469–2474. doi: 10.1073/pnas.071224410
- You YA, Kwon WS, Saidur Rahman M, Park YJ, Kim YJ, Pang MG (2017) Sex chromosome-dependent differential viability of human spermatozoa during prolonged incubation. *Hum Reprod.* 32 (6): 1183-1191. doi: 10.1093/humrep/dex080
- Yuan SS, Xu HZ, Liu LQ. et al. (2017) Different effects of blue and red light-emitting diodes on antioxidant responses in the liver and ovary of zebrafish *Danio rerio*. *Fish Physiol Biochem.* 43: 411. doi:10.1007/s10695-016-0296-1
- Zhang W, Yin L, Tao X, Xu L, Zheng L, Han X, Xu Y, Wang C, Peng J (2016) Dioscin alleviates dimethylnitrosamine-induced acute liver injury through regulating apoptosis, oxidative stress and inflammation. *Environ Toxicol Pharmacol.* 45:193-201. doi: 10.1016/j.etap.2016.06.002.
- Zheng X, Dai W, Chen X, et al. (2015) Caffeine reduces hepatic lipid accumulation through regulation of lipogenesis and ER stress in zebrafish larvae. *J Biomed Sci.* 22:105. doi:10.1186/s12929-015-0206-3
- Zheng Y, Qu J, Qiu L, et al. (2016) Effect of 17 $\alpha$ -methyltestosterone (MT) on oxidation stress in the liver of juvenile GIFT tilapia, *Oreochromis niloticus*. *SpringerPlus.* 5:338. doi:10.1186/s40064-016-1946-6
- Zhou R, Liu L, Guo Y, Yu H, Cheng H, Huang X et al. (2003) Similar gene structure of two *Sox9a* genes and their expression patterns during gonadal differentiation in a teleost fish, rice field eel (*Monopterus albus*). *Mol Reprod Dev.* 66:211-17. doi: 10.1002/mrd.10271
- Zhou L, Charkraborty T, Zhou Q, Mohapatra S, Nagahama Y, Zhang Y (2016) *Rspo1*-activated signalling molecules are sufficient to induce ovarian differentiation in XY medaka (*Oryzias latipes*). *Sci Rep.* 19;6:19543. doi: 10.1038/srep19543



### CAPÍTULO 3.

## EL EFECTO DEL FOTOPERIODO SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS BIOMÉTRICAS DE CRECIMIENTO, EL CONSUMO DE ALIMENTO, LA SUPERVIVENCIA Y LA EXPRESIÓN DE GENES EN *Chirostoma estor*.

### RESUMEN

El fotoperiodo modula las actividades alimentación, crecimiento y reproducción en los peces, aunque los mecanismos moleculares detrás de dichos efectos no han sido elucidados. El propósito de este trabajo es analizar la respuesta de juveniles de *C. estor* sometidos en dos fotoperiodos: a) Fotoperiodo de luz continua (CL) y b) Fotoperiodo simulado control (CS); aplicados a partir de la fertilización y hasta 12 semanas después de la eclosión. Al final del experimento se obtuvieron las variables biométricas, de alimentación, perfiles de hormonas circadianas y un análisis de expresión de genes mediante secuenciación masiva RNA-seq. Los organismos de CL presentaron un mayor crecimiento (66.14% y 17.95% en masa y longitud respectivamente) y un mejor factor de conversión alimenticia (1.618 en CL vs 1.95 en CS) cuando se compara con el fotoperiodo simulado control ( $p < 0.05$ ); sin diferencias significativas en la supervivencia final ( $p > 0.05$ ). En los perfiles de cortisol se reportan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos, pero no para la producción de melatonina ( $p > 0.05$ ) durante la fotofase. Por otro lado el análisis transcriptómico *De Novo* en *C. estor*, indica que existen un total de 68,960 contigs únicos, que se anotaron funcionalmente en 43,314 proteínas. El análisis de enriquecimiento en términos de GO indica que 126,929 términos se encuentran involucrados en procesos biológicos, 98,712 son componentes celulares y 36,670 presentan una función molecular. El análisis Kegg indica 791 anotaciones de los genes en rutas metabólicas primarias, 224 en rutas secundarias y la identificación de 383 procesos biológicos. Además, el análisis de expresión diferencial (RSEM y eXpress) indica que 169 transcriptos se encuentran diferencialmente expresados ( $p < 0.05$ ), de los cuales 141 transcriptos presentan bajos niveles de expresión y solamente 28 transcriptos exhiben altos niveles de expresión en CL. Del total de transcriptos, 115 presentan anotación funcional, 22 tienen anotación ambigua y 11 son secuencias no descritas en las bases de datos. Los genes diferencialmente expresados se encuentran involucrados en procesos que modulan la fototransducción, la sinapsis, el metabolismo, el estrés oxidativo, los ritmos circadianos, el crecimiento y la respuesta inmune, entre otros; de entre los cuales se sugiere que se encuentren los mecanismos que permiten el crecimiento y la supervivencia de los organismos en condiciones de iluminación constante. En conjunto estas evidencias sugieren un claro efecto de la luz continua sobre el crecimiento, consumo de alimento y expresión de genes en *C. estor*, lo que contribuye al conocimiento de los mecanismos moleculares que son regulados por la luz en vertebrados, adicionalmente provee herramientas moleculares de alta calidad para el desarrollo de futuros trabajos en este modelo biológico de importancia económica, cultural y ambiental del altiplano mexicano.



### 3.1. INTRODUCCIÓN

#### 3.1.1. La luz y sus efectos sobre el crecimiento, alimentación y supervivencia en peces teleósteos

La luz ejerce un control directo para sincronizar los ritmos biológicos a nivel fisiológico y molecular en los peces (Mata-Sotres *et al.*, 2015; Carmona-Antoñanzas *et al.*, 2017). El espectro de luz natural cambia diferencialmente bajo el agua de acuerdo a la profundidad (Warrant y Johnsen 2013). La longitud de onda correspondiente a la luz azul (de mayor energía) presenta una mayor penetrabilidad en aguas profundas, mientras que la longitud de onda correspondiente al color rojo (de menor energía) es absorbida rápidamente por las moléculas de agua, por lo que sólo es capaz de penetrar aguas poco profundas (Shin *et al.*, 2014).

Las diferencias en calidad (longitudes de onda) y cantidad (fotoperiodo) de luz pueden ser detectadas por los fotorreceptores retínales y extraretínales de los peces, lo que puede modular la fisiología del crecimiento y reproducción (Migaud *et al.*, 2007; Vera *et al.*, 2010; Bapary *et al.*, 2011). Así como la alimentación, supervivencia y desarrollo en teleósteos (Battaglione y Talbot, 1990; Bayarri *et al.*, 2002; Trotter *et al.*, 2003; Villamizar *et al.*, 2009; Volkoff *et al.*, 2010; Volkoff, 2016; Rønnestad *et al.*, 2017).

En los últimos años en la acuicultura de peces teleósteos se han utilizado sistemas de iluminación tipo LED de amplio espectro (Migaud *et al.*, 2007; Bapary *et al.*, 2011; Choi *et al.*, 2012; Shin *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2014; Takahashi *et al.*, 2016). Estudios realizados con luz blanca LED en el salmón del Atlántico (*S. Salar*) demuestran que bajo estas condiciones de iluminación, no se ocasionan daños en la retina, ni efectos de estrés en los peces (Migaud *et al.*, 2007). En larvas de Lubina (*Dicentrarchus labrax*) se reporta un mayor crecimiento y supervivencia bajo condiciones de iluminación LED con un fotoperiodo de 24 horas luz (24L:0D). Sin embargo, se reportan malformaciones en la vejiga natatoria y en la mandíbula inferior (Villamizar *et al.*, 2009).

Por otro lado, en la damisela (*Chrysiptera cyanea*) se observó que la luz LED de amplio espectro, tuvo efectos inhibitorios en la maduración ovárica (Bapary *et al.*, 2011). Contrario a lo observado en el pez dorado (*Carassius auratus*), la luz verde (530 nm) provoca efectos de maduración gonádica a través de acciones directas en el eje Hipotálamo, Hipófisis, Gónada (Shin *et al.*, 2014). Estas breves evidencias indican que la iluminación LED al igual que la luz natural, puede modular diversos mecanismos fisiológicos en peces (como el crecimiento y la reproducción), pero también se observa que los efectos y sensibilidades son especie-específicas. Por lo que es factible realizar estudios fisiológicos mediante el uso de esta tecnología lumínica en teleósteos para cada especie de interés.



Tanto en peces como en vertebrados el eje de crecimiento está conformado por la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (Growth hormone release hormone, GhRH), la hormona de crecimiento (Gh) y el factor de crecimiento tipo insulínico-1 (Insulin-like growth factor, Igf-1), principalmente relacionados con el crecimiento somático y muscular (Velloso, 2008). No obstante, estas hormonas también inciden sobre los mecanismos de reproducción (Hull y Harvey, 2002), alimentación (Johnsson y Björnsson, 1994), osmorregulación (Sakamoto y McCormick, 2006) y comportamiento (Jonsson y Björnsson, 2002). La GhRH es producida en el núcleo arcuado del hipotálamo y es liberada hacia la hipófisis para producir la hormona de crecimiento (Mano-Otagiri *et al.*, 2006), la cual tiene como sus principales órganos blanco el hígado (Fuentes *et al.*, 2013) y el músculo (Le Roith *et al.*, 2001), pero también se ha descrito su acción en gónadas, cerebro y células inmunes (Chang y Wong, 2009).

Entre los mecanismos de regulación de la Gh se encuentran la estimulación a nivel hipotalámico-hipofisario *in vitro* e *in vivo* por factores orexigénicos (estimulantes del apetito) como la ghrelina (Picha *et al.*, 2009) y por bajos niveles de Igf-1 en el organismo (Won y Borski, 2013), entre otras hormonas y mecanismos de retroalimentación. La inhibición de Gh está regulada por dos mecanismos principales: a) un mecanismo de retroalimentación negativa que ejerce el mismo Igf-1 a nivel hipotalámico y b) un mecanismo a través de Somatostatina (Sst), el cuál es un potente inhibidor hipotalámico que bloquea la acción de Igf-1 y Gh directamente en la hipófisis, hígado y órganos blanco (Nelson y Sheridan, 2005; Canosa *et al.*, 2007; Sheridan y Hagemester, 2010). La Sst reduce la expresión de Gh aun cuando ésta sea estimulada por factores neuroendocrinos como la hormona liberadora de gonadotropinas (Gnrh), la dopamina (Da), (Yunker, Smith *et al.*, 2003; Yunker y Chang, 2004) y la ghrelina (Unniappan y Peter, 2005; Sheridan y Hagemester, 2010; Sato *et al.*, 2012).

Conjuntamente el fotoperiodo, la temperatura, el estatus nutricional, las tirotrinas, las gonadotropinas, los esteroides sexuales y la pulsatilidad inherente a la secreción de Gh en cada especie de peces, modulan la expresión de esta hormona de manera muy diversa, lo que indica una relación estrecha de los mecanismos endocrinos de crecimiento, alimentación y reproducción (Trudeau, 1997; Peter y Chang, 1999; Stefano *et al.*, 1999; Chang y Habibi, 2002; Einarsdottir *et al.*, 2002; Falcon *et al.*, 2003; Canosa y Peter, 2005; Canosa, Chang *et al.*, 2007; Chang y Wong, 2009; Volkoff *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2012; Volkoff *et al.*, 2016; Rønnestad *et al.*, 2017; Takahashi *et al.*, 2017). Que genera un vaivén de redireccionamiento energético hacia los distintos procesos.

Recientemente se demostró que la exposición lumínica (luz azul) en células epidérmicas y fotorreceptores, produce condiciones de estrés oxidativo a través de la recepción de los fotones por bases nitrogenadas de flavina (Nakashima *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2017<sup>a</sup>). Lo cual tiene como consecuencia, la liberación



del anión superóxido, que es a su vez convertido en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) por la acción de las superóxido reductasas (Niki, 2016; Sies, 2017; Sies *et al.*, 2017).

El  $H_2O_2$  directamente puede modular la proliferación y la diferenciación celular en vertebrados (He *et al.*, 2004; He *et al.*, 2008; Sies, 2017; Sies *et al.*, 2017). El ( $H_2O_2$ ) actúa como una molécula de señalización del estrés oxidativo, que activa al receptor (tirosina-cinasa) del factor de crecimiento epidérmico (Egfr), el cual inicia una cascada de señalización intracelular, que activa las rutas PI3-Akt (Phosphatidylinositol 3' -kinase, PI3K - Protein kinase B, akt), mTOR (Mamalian Target of Rapamycin) y Ras-Raf-Mek-Erk-Mapk (Mitogen-Activated Protein Kinases), que finalmente promueven la transcripción de genes relacionados con la progresión de la fase G1 del ciclo celular, relacionada con la supervivencia, diferenciación y crecimiento (Strozyk y Kulms, 2013; Wee y Wang, 2017; Chen *et al.*, 2017<sup>b</sup>). Este mecanismo vincula directamente la exposición de la luz con el crecimiento celular de los vertebrados. Sin embargo, en peces teleósteos estas rutas han sido poco descritas, por lo que se requiere de mayores esfuerzos de investigación para comprender los mecanismos que ligan la percepción lumínica con el crecimiento y desarrollo de estos organismos.

La alimentación en peces está regulada por diversos factores externos (temperatura, salinidad, fotoperiodo, predadores, estrés etc.), e internos (genética, estilo de vida, metabolismo, etc.) (Rønnestad *et al.*, 2017). Así como por hormonas que son producidas por el cerebro (Hipótalamo) y ciertos órganos periféricos (Tracto gastrointestinal, Hígado, tejido adiposo, etc.). Estas hormonas incluyen factores estimulantes (orexigénicos) y factores inhibidores (anorexigénicos) del apetito (Volkoff *et al.*, 2005; Gorissen *et al.*, 2006; Volkoff, 2016; Volkoff *et al.*, 2017; Rønnestad *et al.*, 2017).

Entre los factores orexigénicos más importantes en peces se encuentran: Apelina, ghrelina (Ghrl), orexina, galanina, secretoneurina, hormona concentradora de melanina (Mch), proteína r-agouti (Agrp), neuropéptido Y (Npy) y hormonas tiroideas. En contraparte entre los factores anorexigénicos se encuentran: Leptina, nesfatina1 (nefa-1), espexina, amilina, colecistokinina (Cck), hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), hormona estimulante de melanocitos (Msh), neuromedina (Nmu), octadecaneuropéptido (Odn), polipéptido activador de la adenilato ciclase hipofisiaria (Pacap), arginina-vasotocina (Avt), prolactina (Prp), péptido YY (Pyy), factor liberador de corticotropinas (Crf), urocortina (Ucn), transcripto regulado por cocaína y anfetamina (Cart) y pro-opiomelanocortina (Pomc) (Volkoff, 2016).

La ghrelina (Ghrl), la cuál es producida por las células X/A (ghrelin cells) del tracto gastrointestinal (Stengel *et al.*, 2010) ha sido descrita como la señal biológica universal de la falta de alimento (Sato *et al.*, 2012). Esta hormona orexigénica es la única conocida que se produce periféricamente y que tiene una acción central hipotalámica en la ingesta de alimentos (Stengel y Tache



2012). En peces se ha descrito que la Ghrl está involucrada no sólo en la ingesta de energéticos, sino que también cumple funciones en la liberación de la hormona de crecimiento (Gh), así como de la hormona luteinizante (Lh), por lo que se le ha considerado como un potente factor orexigénico hipofisiotrópico que afecta los ejes de alimentación, crecimiento y reproducción (Unniappan y Peter 2005; Unniappan, 2010). Además, la molécula de Ghrl posee propiedades para disminuir la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el estómago de ratas (Coskun *et al.*, 2013), células cardíacas H9c2 (Zhang *et al.*, 2011) y en músculo (Gortan Cappellari *et al.*, 2017), al evitar la peroxidación lipídica, promover la actividad de enzimas antioxidantes como catalasa, superóxido reductasas, glutatión reductasa y peroxidasa, lo que sugiere un rol activo de Ghrl en la regulación de los niveles de estrés oxidativo en vertebrados.

En contraparte la Nesfatina-1/Nucleobidina-2 (Nefa-1/Nucb-2) es un potente factor anorexigénico que inhibe la ingesta de alimentos y agua (Garcia-Galiano *et al.*, 2012). Cabe mencionar que la Nefa-1/Nucb-2 se expresa principalmente en las células X/A (ghrelin cells) por lo que se ha sugerido que estas células cumplen una función dual única en la regulación de la ingesta y saciedad de los vertebrados (Stengel y Tache 2012). En el caso particular de los peces, su expresión se ha encontrado en el hipotálamo (Oh *et al.*, 2006), además de la hipófisis, hígado, intestino y ovario (Gonzalez *et al.*, 2010; Gonzalez *et al.*, 2012). Así como la Nefa-1/Nucb-2 participa en el control de la reproducción mediante la inhibición de la secreción de gonadotropinas durante el inicio de la pubertad (Garcia-Galiano *et al.*, 2010; Gonzalez *et al.*, 2012).

Aunado a lo anterior en el núcleo arcuato del hipotálamo de peces y vertebrados coexisten dos poblaciones de neuronas, las neuronas mediales AgRP/NPY (orexigénicas) y las neuronas laterales CART/POMC (anorexigénicas), las cuales están involucradas en la regulación central neuroendócrina de la alimentación, ya que son sensibles a los niveles metabólicos de glucosa, aminoácidos, ácidos grasos, leptina e insulina (Baltatzi *et al.*, 2008; Sapru, 2013; Dudás, 2013; Drougard *et al.*, 2015; Volkoff *et al.*, 2016; Takahashi *et al.*, 2016; Conde-Sieira y Sonengas, 2017).

En las neuronas AgRP/NPY la ghrelina activa la oxidación de ácidos grasos y la expresión de la proteína desacoplante 2 (Ucp2) en la mitocondria, lo que disminuye la presencia de ROS. Este mecanismo es clave para permitir la hiperpolarización de las neuronas AgRP/NPY (inhibidas por la glucosa obtenida de la ingesta de alimentos) y la consecuente activación de la respuesta orexigénica durante un estado de balance energético negativo (Andrews *et al.*, 2008; Vozza *et al.*, 2014; Toda y Diano, 2014; Nasrallah y Horvath, 2014; Drougard *et al.*, 2015; Delgado *et al.*, 2017). En contraste durante un estado energético positivo en las neuronas CART/POMC (activadas por glucosa) se incrementa la producción de ROS debido a una baja actividad de Ucp2. En consecuencia, estas neuronas se despolarizan para activar las respuestas anorexigénicas en presencia de altos niveles de glucosa (Andrews *et al.*, 2008;



Toda y Diano, 2014; Nasrallah y Horvath, 2014; Drougard *et al.*, 2015; Delgado *et al.*, 2017).

El conjunto de evidencias sugieren que el control de la alimentación se debe principalmente al balance del estado energético a través de la señalización por  $H_2O_2$  en las neuronas hipotalámicas (AgRP/NPY y CART/POMC), así como en las células X/A del intestino. Estos controladores orexigénicos/anorexigénicos no sólo intervienen en los mecanismos endocrinos de alimentación, sino que pueden incidir sobre otras funciones fisiológicas como el crecimiento y la reproducción (Delgado *et al.*, 2017), por lo que es necesario realizar estudios detallados que nos provean información de la respuesta de estos actores en los periodos de presencia de luz ambiental y estrés oxidativo en los peces, en donde también participa el  $H_2O_2$ .

Por último en diversos modelos animales se ha descrito que la exposición a diferentes condiciones lumínicas ocasionan una regulación del estrés oxidativo y la supervivencia (Nakanishi-Ueda *et al.*, 2013; Kuse *et al.*, 2014; Nakashima *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2017<sup>a</sup>; Ishii y Rohrer, 2017; Yacout y Gaillard, 2017). La supervivencia de los organismos esta directamente relacionada con las respuestas ante condiciones intrínsecas o extrínsecas que promueven la muerte de las células en los tejidos; actualmente se han descrito tres tipos morfológicos principales de muerte celular, la apoptosis (tipo 1), la autofagia (tipo 2) y la necrosis (tipo 3) (Tait *et al.*, 2014; Green y Llambi, 2015).

La apoptosis (Tipo 1) puede ocurrir por la ruta de activación de receptores de muerte celular, la ruta de activación por inflamación, la ruta de deficiencia inmune primaria y la ruta mitocondrial (Green y Llambi, 2015), esta última sucede a través de la interacción del retículo endoplasmático (RE) con la mitocondria, cuando los niveles de estrés aumentan (Fulda *et al.*, 2010; Dufey *et al.*, 2014; Tadic *et al.*, 2014).

En condiciones de estrés en el RE se presenta un bajo contenido de Calcio ( $Ca^{+}$ ) debido a que lo transfiere a la mitocondria (Tadic *et al.*, 2014; Grootjans *et al.*, 2016; Carreras-Sureda *et al.*, 2017). En el RE se acumulan proteínas no plegadas en su interior, lo que activa la respuesta de proteínas no plegadas (UPR) (Carreras-Sureda *et al.*, 2017); que consiste en la transcripción de proteínas chaperonas, la disminución de la síntesis proteica y la degradación proteosómica de las proteínas no plegadas.

Sin embargo, cuando existe una acumulación excesiva de proteínas no plegadas en el (RE), ocurre la activación de la ruta de caspasas-proteasas y la consecuente apoptosis celular (Dudek *et al.*, 2009; Tadic *et al.*, 2014). La respuesta UPR es muy importante ya que integra la información a cerca del tipo, intensidad y duración del estímulo de estrés, por lo que además de estar involucrada en la supervivencia celular, también se ha reportado acciones fisiológicas en procesos metabólicos, de diferenciación celular e inmunidad innata (Rutkowsky y Hedge, 2010; Dufey *et al.*, 2014; Grootjans *et al.*, 2016).



En la mitocondria, la acumulación de  $\text{Ca}^+$  induce la producción de ROS en el complejo III e inhibe el complejo IV mitocondrial, lo que genera un aumento de las condiciones de estrés oxidativo en la célula (Coussee *et al.*, 2011; Tadic *et al.*, 2014; Grootjans *et al.*, 2016). Esto se produce por la permeabilización de la membrana externa mitocondrial y la liberación del Citocromo C (transportador electrónico entre los complejos III y IV), con la consecuente activación de la ruta de caspasas y apoptosis (Venkatesh *et al.*, 2012; Vannuvel *et al.*, 2013; Tadic *et al.*, 2014; Green y Llambi, 2015; Oyinloye *et al.*, 2015). Adicionalmente el aumento de los niveles de ROS en la célula crean condiciones que evitan la retención del  $\text{Ca}^+$  en el RE (Grootjans *et al.*, 2016) por lo que existe una interacción recíproca entre la homeostasis de  $\text{Ca}^+$  y la producción de ROS, que controla directamente el destino de las células hacia la apoptosis o la supervivencia (Tadic *et al.*, 2014).

Además, el estrés oxidativo también genera mutaciones en las bases de DNA, la principal lesión mutagénica es la 8-oxo-7,8-dihidroguanina, que se hibrida con adenina en lugar de citosina y genera mutaciones después de la replicación, con la consecuente apoptosis (David *et al.*, 2007; Kobayashi *et al.*, 2008). En modelos de vertebrados se ha observado que la expresión de Ucp2 aumenta la supervivencia neural y retinal, a través de la disminución de especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species, ROS) en las células, por lo que el control del estrés oxidativo por proteínas y enzimas antioxidantes es clave para la supervivencia de los organismos (Horvath *et al.*, 2003; Barnstable *et al.*, 2016; Hans y Barnstable, 2016).

En resumen, la exposición a condiciones lumínicas y la respuesta biológica ante el estrés oxidativo generado, determina la modulación del crecimiento, alimentación y supervivencia en vertebrados. Sin embargo, la mayoría de los mecanismos que regulan estas acciones fisiológicas por efectos del fotoperiodo no han sido descritos en peces, por lo que se requiere desarrollar trabajos que permitan ampliar el conocimiento de la respuesta biológica de los teleósteos ante diferentes condiciones lumínicas. En el presente trabajo se reporta el efecto del fotoperiodo sobre el crecimiento, la alimentación y la supervivencia en el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*.

### **3.1.2. El efecto de la luz sobre los ritmos circadianos de melatonina y cortisol en peces teleósteos**

El sistema circadiano es responsable de la organización temporal de las funciones fisiológicas de los organismos, entre ellos los peces teleósteos. Este sistema consiste de una red de osciladores centrales y periféricos que pueden sincronizarse por ciclos de luz/oscuridad, así como de alimentación/ayuno (Isorna *et al.*, 2017; Delgado *et al.*, 2017). La melatonina y el cortisol se encuentran entre las principales moléculas que sincronizan los sistemas circadianos por efecto de las condiciones lumínicas (Isorna *et al.*, 2017).



La melatonina (N-Acetil-5-Metoxitriptamina) es una molécula indólica sintetizada por un conjunto de enzimas a partir del aminoácido esencial Triptofano. La enzima Aanat (Aarquilamina N-acetiltransferasa) es la enzima limitante de producción. Esta enzima se produce principalmente en los pinealocitos de la glándula pineal de peces y vertebrados (Falcon *et al.*, 2003; Falcon *et al.*, 2010; Migaud y Davie, 2007; Martínez-Chávez *et al.*, 2008; Nikaido *et al.*, 2010; López-Patiño *et al.*, 2014).

Adicionalmente se ha demostrado la expresión de melatonina en el ojo, gónada, cerebro, músculo, hígado, intestino, entre otros (Bayarri *et al.*, 2002; Migaud *et al.*, 2007; Kalamarz *et al.*, 2009; Bayarri *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2010; Shin *et al.*, 2011; Lima-Cabello *et al.*, 2014; Feng y Bass, 2016; Khan *et al.*, 2016; Maitra y Hasan, 2016; Muñoz-Pérez *et al.*, 2016; Kulczykowska *et al.*, 2017; Rajiv *et al.*, 2017). Esta diversidad de sitios de producción de melatonina en los peces es debido a que existen dos isoformas de Aanat, la isoforma Aanat-1, que se encuentra en los tejidos extrapineales y Aanat-2 que se encuentra principalmente en la glándula pineal (Cazaméa-Catalan *et al.*, 2014).

La producción de melatonina en vertebrados se genera activamente durante la fase nocturna, con altos valores de concentración (acrofase) a nivel plasmático y una producción reducida (batifase) durante la fase diurna (Redlin, 2001; Falcon *et al.*, 2010; Pevet y Challet, 2011; Rajiv *et al.*, 2017). Durante la fase nocturna, en las neuronas de las fibras simpáticas preganglionares se produce un incremento en la catecolamina noradrenalina, que activa los receptores Beta-Adrenérgicos en la glándula pineal para estimular la producción de cAMP (Cyclic adenosine monophosphate), el que a través de PKA (Protein kinase A) y la fosforilación de CREB (cAMP response element-binding) promueve la transcripción de Aanat. Adicionalmente, PKA también participa en la fosforilación post-traducciona de la enzima Aanat protegiéndola de la degradación proteosómica (Schomerus y Korf, 2005; Pandi-Perumal *et al.*, 2007; Mitchell y Weinshenker, 2010; Alkozi *et al.*, 2017).

La actividad de los receptores adrenérgicos (Alfa/Beta) de la pineal y los elementos del promotor de Aanat son regulados negativamente por el complejo proteico NF- $\kappa$ B (Nuclear factor  $\kappa$ -light-chain-enhancer of activated B cells), debido a esta relación se requiere de una disminución de la expresión de NF $\kappa$ B para que la adrenalina estimule la producción de melatonina (Markus *et al.*, 2013). En mamíferos la corticoesterona suprime la expresión de NF $\kappa$ B, lo que permite la actividad de los receptores adrenérgicos, así como la síntesis de melatonina. A su vez esta hormona disminuye la expresión de NF $\kappa$ B en los pinealocitos y células inmunes, lo que sugiere una interrelación entre la respuesta de estrés, el sistema inmunológico y la producción de la melatonina en los vertebrados (Markus *et al.*, 2013; Da Silveira *et al.*, 2017; Fernandes *et al.*, 2017).

Aunado a estas observaciones, un estudio reciente reporta que la traducción de Aanat, está controlada también por la ribonucleoproteína heterogénea R



(hhRNP R), que interactúa con su región 5' UTR (untranslated region) y contribuye con un sitio de entrada ribosomal interno (IRES), lo que mejora sustancialmente la producción de la enzima (Lee *et al.*, 2015).

La melatonina producida en la glándula pineal, actúa como un fotómetro que transduce los ciclos de luz/obscuridad en una señal hormonal que sincroniza los relojes circadianos a través del torrente sanguíneo de los peces (Choi *et al.*, 2016; Isorna *et al.*, 2017). La hormona cumple sus acciones endocrinas mediante los receptores acoplados a proteínas-G (Mt1 y Mt2), receptores que se encuentran ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central y en los tejidos periféricos de vertebrados (Lima-Cabello *et al.*, 2014; Emet *et al.*, 2016). Los receptores de melatonina activados por su ligando, inhiben la producción de cAMP, que disminuye la actividad de PKA y la fosforilación de CREB, lo que controla la transcripción de una multiplicidad de genes relacionados con la producción de neuropéptidos y proteínas reloj, que a su vez controlan los ritmos circadianos en los tejidos (Dibner *et al.*, 2010; Dubocovich *et al.*, 2010; Sanchez-Bretaño *et al.*, 2015; Emet *et al.*, 2016).

La melatonina también inhibe la actividad de los proteosomas que se encargan de la degradación de las proteínas reloj; Per (period), Cry (Cryptochrome), Bmal1 (Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator Like 1) y Nr1d1 (Nuclear Receptor Subfamily 1 Group D Member 1), por lo que esta hormona controla a diferentes niveles la producción y mantenimiento de las proteínas relacionadas con los ritmos circadianos (Vriend y Reiter, 2015).

Adicionalmente la hormona melatonina presenta potentes funciones antioxidantes (Maitra y Hasan *et al.*, 2016), que disminuye la presencia de especies reactivas de oxígeno/nitrógeno, promueve la transcripción de glutatión y su enzima antioxidante glutatión reductasa, inhibe la transcripción de la enzima prooxidante glutatión peroxidasa (Cardinali *et al.*, 2014) y en condiciones de estrés mantiene la permeabilidad de la membrana mitocondrial ante el incremento de  $Ca^{+}$ , lo que evita la apoptosis celular (Jou *et al.*, 2010). Estas múltiples evidencias proponen que en vertebrados en proponen que la melatonina es una molécula cronobiológica y citoprotectora con funciones clave en la regulación de los ritmos circadianos y el control del estrés oxidativo en vertebrados causado por acción de la luz.

En conjunto con la melatonina, el principal glucocorticoide cortisol también presenta ritmos circadianos de producción, controlados principalmente por los ciclos de iluminación y alimentación en vertebrados (Huang *et al.*, 2010; Montoya *et al.*, 2010; Nikaido *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2013; López-Patiño *et al.*, 2014; Delgado *et al.*, 2017; Tahara *et al.*, 2017; Da Silveira *et al.*, 2017). En peces el cortisol participa en la respuesta ante agentes estresantes y es producido por las células interrenales de la parte cefálica del riñón, que están asociadas a células cromafines (catecolaminérgicas) y linfoides (Isorna *et al.*, 2017). El cortisol en los peces controla principalmente el metabolismo energético, la regulación osmótica, la respuesta inmune, la alimentación, el



crecimiento y los ritmos circadianos (Ellis *et al.*, 2012; Cortes *et al.*, 2017; Rosengren *et al.*, 2017; Isorna *et al.*, 2017; Delgado *et al.*, 2017).

En mamíferos el sistema nervioso simpático y el núcleo supraquiasmático (SCN) controlan los ciclos de actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenales (HPA), lo que permite una regulación circadiana de la liberación de los glucocorticoides (Spiga *et al.*, 2014; Schibler *et al.*, 2015; Da Silveira *et al.*, 2017). La luz puede regular la actividad circadiana del eje HPA al incidir directamente en el SCN, a través del tracto retinohipotalámico. Recientemente se ha demostrado que los estímulos lumínicos son capaces de controlar directamente los ciclos circadianos en órganos periféricos (Kießling *et al.*, 2014; Huse *et al.*, 2015; Kofuji *et al.*, 2016).

En los peces existen escasas evidencias de los mecanismos moduladores de los ritmos en el eje hipotálamo-hipófisis-interrenales (HPI), aunque se ha demostrado que la expresión de los genes de pro-opiomelanocortina (*pomc*), del factor liberador de corticotropina (*crf*), del receptor de *crf* en el cerebro (López-Olmeda *et al.*, 2013), así como el cortisol plasmático y los genes reloj (*per*, *cry*, *clock*) en el tejido interrenal exhiben una expresión circadiana (Isorna *et al.*, 2017).

La activación del eje HPA/HPI ocurre inicialmente en el hipotálamo, cuando se incrementan los niveles de estrés oxidativo y la producción del factor liberador de corticotropinas (CRF), que a su vez permiten la activación de las neuronas de POMC en el hipotálamo y la hipófisis (Drougard *et al.*, 2015; Delgado *et al.*, 2017). Estas neuronas transcriben y traducen el polipéptido precursor de Proopiomelanocortina (*Pomc*), el cual es procesado por prohormonas convertasas que liberan diversos productos peptídicos, entre ellos la hormona adrenocorticotropina (ACTH); que es transportada por el torrente sanguíneo hasta la células adrenales, donde se une a los receptores de melanocortina (MCR) para activar la cascada de señalización (cAMP/PKA/CREB) y la transcripción de diversas enzimas esteroidogénicas involucradas en la producción de cortisol, en la mitocondria de las glándulas adrenales (Josep *et al.*, 2013; Calebiro *et al.*, 2015; Da Silveira *et al.*, 2017; Menzies *et al.*, 2017).

En peces se ha observado que el agonista de cortisol (dexametasona) puede controlar la expresión de genes circadianos en diversos órganos periféricos, a través de elementos de respuesta a glucocorticoides (GREs) en el promotor de los genes reloj *per1*, *clock1*, *bmal1* (Huang *et al.*, 2010; Nikaido *et al.*, 2010; Cavallari *et al.*, 2011; Lopez-Patiño *et al.*, 2014; Sanchez-Bretaño *et al.*, 2016; Isorna *et al.*, 2017; Sousa *et al.*, 2017). Incluso se ha demostrado que bajo condiciones de estrés, el cortisol inhibe la producción de melatonina en la pineal, por lo que existe una estrecha relación entre ambas hormonas y el control circadiano de las actividades fisiológicas en los organismos (López-Patiño *et al.*, 2014).



Bajo condiciones de 12 luz: 12 oscuridad, en el Kilifish (*Fundulus grandis*) y la tilapia (*Oreochromis mozambicus*) se observa un pico máximo de cortisol (acrofase) al inicio de la fase luminosa (García y Meier, 1973; Nikaido *et al.*, 2010). Mientras que en la lubina europea (*D. labrax*), la tenca (*Tinca tinca*) y el lenguado (*Solea senegalensis*) la acrofase se encuentra al inicio de la fase oscura (Planas *et al.*, 1990; De Pedro *et al.*, 1998; López-Olmeda *et al.*, 2013).

En la trucha café (*Salmo trutta*) y la trucha japonesa (*Salvelinus leucomaenis*) el pico máximo se encuentra durante en la fase oscura (Pickering y Pottinger, 1983; Yamada *et al.*, 2002). Por otro lado los juveniles de lubina (*D. labrax*) y salmón (*Salmo salar*) bajo condiciones eurihalinas, exhiben dos picos de cortisol durante el día (Cerdá-Reverter *et al.*, 1998; Ebbenson *et al.*, 2008). Estas evidencias, indican que existe una gran variación circadiana en la producción de cortisol entre las especies de peces e incluso durante las fases de desarrollo como se advierte en la lubina.

Bajo condiciones ambientales constantes se reporta que los ritmos circadianos de cortisol son persistentes en la dorada (*Sparus auratus*), en el lenguado (*S. senegalensis*) y en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), por lo que se ha sugerido la presencia de osciladores endógenos (López-Olmeda *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2013; Hernández-Pérez *et al.*, 2015). Sin embargo, en el pez dorado *C. auratus*, se reporta que bajo un fotoperiodo de luz continua (CL), los ritmos de alimentación controlan directamente la producción de cortisol, el cual se libera antes de la actividad alimentaria (Spieler y Noeske 1981; Spieler y Noeske, 1984). Este incremento del cortisol se correlaciona directamente con la activación de factores orexigénicos en el hipotálamo (Vera *et al.*, 2007). Incluso se observa que en el hígado de *C. auratus* el cortisol induce la expresión de los genes *per1a*, *per1b* y reprime la expresión de *bmal1a* y *clock*, lo que en conjunto indica un control directo del cortisol sobre los ritmos circadianos en esta especie (Sanchez-Bretaña *et al.*, 2015).

En la dorada (*S. auratus*) también se observó que los ritmos de alimentación y factores estresantes controlan la producción de cortisol (Montoya *et al.*, 2010; Vera *et al.*, 2014). En organismos que reciben alimento a tiempos fijos presentan niveles más bajos de cortisol cuando se compara con peces alimentados en tiempos aleatorios. Estos resultados sugieren que si el alimento se ofrece en intervalos fijos de tiempo, funciona como un sincronizador que reduce los niveles de estrés en los peces (Sánchez *et al.*, 2009).

En el salmón (*S. salar*) se observó un incremento en los niveles de cortisol plasmático en condiciones de luz continua (Huang *et al.*, 2010), pero en otras especies como la perca (*Perca fluviatilis*), la brema de roca (*Oplegnathus fasciatus*) y el esturión (*Acipenser persicus*) no se presenta ningún cambio significativo en los niveles de producción de cortisol (Falahatkar *et al.*, 2012; Brüning *et al.*, 2015; Biswas y Takii, 2016).



En conjunto las evidencias sugieren que las respuestas ante diferentes condiciones de alimentación y fotoperiodo son especie específicas, esto indica que deben realizarse estudios detallados para conocer las respuestas biológicas en cada una de las especies de interés acuícola o científico. Debido a lo anteriormente expuesto, en el presente trabajo se propuso conocer los niveles de expresión de las hormonas de melatonina y cortisol en organismos mantenidos bajo condiciones de luz continua (CL) vs un fotoperiodo simulado control (CS) con el fin de determinar si existe una influencia del fotoperiodo en los ritmos circadianos de *C. estor*.

### 3.1.3. Sistemas redox: un enfoque integral de investigación en vertebrados

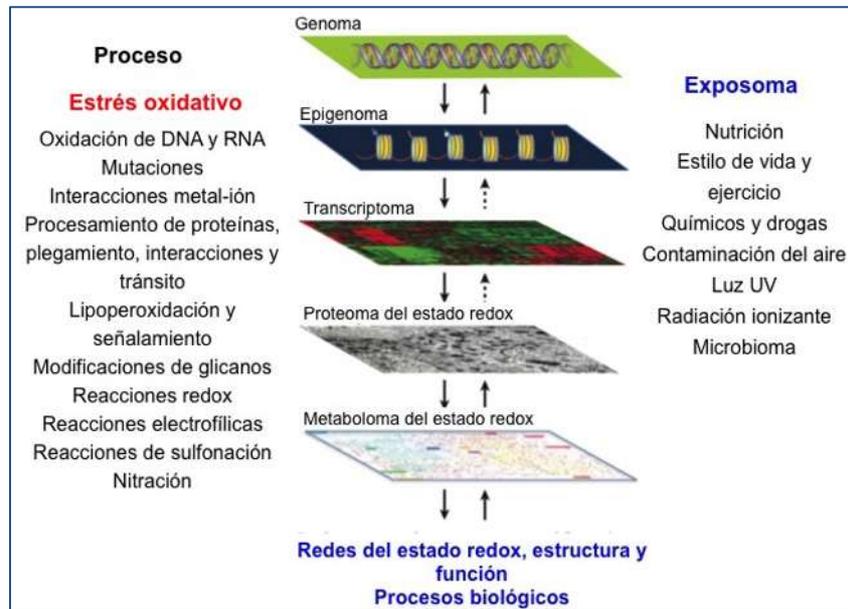
De manera general el código redox es un conjunto de principios moleculares a nivel del genoma, epigenoma, transcriptoma, proteoma y metaboloma (Figura 14) que definen la biodisponibilidad espacio-temporal de las moléculas de nicotinamida adenina dinucleótido/fosfato ( $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$ ), el intercambio tior/disulfuro y la capacidad del sistema antioxidante en los sistemas biológicos (Jones y Sies, 2015; Sies *et al.*, 2017).

El código redox depende principalmente de las reacciones donde interviene el oxígeno, por lo que activación/desactivación del  $\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , contribuye a la organización espacio-temporal que define los procesos de diferenciación, desarrollo y adaptación a nuevos ambientes de los organismos (Knoefler *et al.*, 2012; Jones y Sies 2015).

Así, el estrés oxidativo presenta un carácter dual, ya que un exceso de oxidantes pueden dañar a las biomoléculas, mientras que niveles oxidativos fisiológicos son necesarios para controlar los procesos biológicos, a través del sistema redox que utiliza al  $\text{H}_2\text{O}_2$  como segundo mensajero de las señales ambientales y que activa las respuestas antioxidantes (Marinho *et al.*, 2014; Sies *et al.*, 2014; Niki *et al.*, 2016; Sies *et al.*, 2017).

Las respuestas antioxidantes en los organismos reflejan un complejo mecanismo de regulación, que involucra diferentes vías de modulación de la actividad catalítica antioxidante (Brigelius-Flohé y Flohé 2011; Jones y Sies, 2015; Niki *et al.*, 2016; Sies *et al.*, 2017). Aunque existen algunos estudios de los efectos de la luz a nivel de expresión de genes y de la actividad de enzimas antioxidantes en peces, las investigaciones de las respuestas antioxidantes ante diversos fotoperiodos aun son muy escasas (Head y Malison 2000; Shin *et al.*, 2011; Choi *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2014; Giannetto *et al.*, 2014).

En los últimos años se han desarrollado robustas herramientas ómicas de investigación que ofrecen la posibilidad de entender los fenómenos biológicos a diferentes niveles de regulación, para obtener una comprensión refinada del control de los componentes redox y su organización funcional dentro de sistemas biológicos complejos (Liu *et al.*, 2011; Sies *et al.*, 2017) (Figura 14).



**Figura 14.** Interrelación de los sistemas redox en los diferentes niveles biológicos. El estrés oxidativo, ya sea como eustrés oxidativo reversible (estrés benéfico) en la regulación redox o como causa de daño a las biomoléculas (desequilibrio oxidativo), impacta a todos los niveles biológicos en la regulación redox, desde la integridad del genoma hasta el mantenimiento del metaboloma. El metabolismo endógeno y el impacto exógeno (exposoma) afectan los procesos biológicos a través de redes redox. (Modificado de Sies *et al.*, 2017).

En el presente trabajo se realizó el transcriptoma y metaboloma del pez blanco de Pátzcuaro *C. estor* bajo dos condiciones de fotoperiodo (24L:0D vs 12L:12D); para conocer cuáles son las implicaciones de estos tratamientos lumínicos sobre la expresión global de genes y la producción de metabolitos (Apéndice A).

Adicionalmente se realizó una secuenciación genómica para conocer en su totalidad el genoma de *C. estor* (Apéndice B). El uso de estas herramientas ómicas permite obtener un conocimiento integral bajo el enfoque de los sistemas redox y generar poderosas herramientas moleculares para el diseño de trabajos futuros de investigación en *C. estor*, que permitan comprender con una mayor profundidad los mecanismos de control que ejercen las señales ambientales sobre la fisiología de los organismos. Finalmente en este capítulo se reporta el efecto del fotoperiodo (24L:0D vs 12L:12D) sobre el crecimiento, la alimentación, la supervivencia, la concentración de hormonas circadianas (melatonina/cortisol) y un análisis de expresión de genes (transcriptómica).

## 3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.2.1. Condiciones experimentales

El sistema experimental consistió de seis tanques (3 por cada condición experimental, con una capacidad de 90 litros cada uno. Con un sistema de filtración mecánica y biológica. El flujo de agua de los tanques fue de 1.3 l·m<sup>-1</sup>,



el oxígeno fue mantenido a  $5.5 \pm 0.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , el pH en 7.5, con una salinidad de  $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  (Martínez-Palacios *et al.*, 2004) y la temperatura se mantuvo a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  con un sistema automático (LN-5800, BOYU).

Durante la serie experimental la salinidad fue evaluada con un refractómetro (S/Mill-E 0-100  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , ATAGO), la temperatura fue monitoreada con un termómetro de mercurio ( $-20^\circ\text{C}$  to  $110^\circ\text{C}$ ), el pH, el amonio total ( $\text{NH}_3\text{-NH}_4^+$ ) y los niveles de nitritos ( $\text{NO}_2$ ) fueron evaluados con un test colorimétrico (FF-3, HACH). Los niveles de oxígeno disuelto fueron monitoreados con un oxímetro (51B, YSI). La intensidad de luz de lámparas LED fue monitoreada con un luxómetro digital (YK-10LX Lutron) y el espectro con un espectrómetro (USB2000+VIS-NIR Ocean Optics Spectrometer).

Para el experimento se obtuvieron 2,250 huevos fertilizados que fueron divididos en tres réplicas, para cada tratamiento de fotoperiodo: a) 12 h Luz: 12 h Oscuridad (CS) y b) 24 h Luz: 0 h Oscuridad (CL) hasta las 12 semanas post-eclosión (SPE), para determinar los niveles de hormonas circadianas (Melatonina y Cortisol) así como los análisis transcriptómicos (Figura 1).

### 3.2.2. Análisis biométricos de crecimiento, consumo de alimento y supervivencia

Para determinar el crecimiento se realizó un muestreo inicial de los organismos en el día de eclosión y posteriormente 3 muestreos a las 4, 8 y 12 semanas post eclosión (SPE). Por cada replica experimental se obtuvieron 5 individuos ( $n=15$ ), en cada punto de muestreo, por cada tratamiento (CS y CL), los cuales fueron sedados con agua helada para después obtener la masa individual con una balanza analítica (Denver Instrument modelo APX-200), así como la longitud estándar con un vernier digital (AUTOTEC modelo A-1150).

Con los datos obtenidos de masa corporal y longitud estándar, se calculó el factor de condición (FC; Fórmula 1), la tasa de crecimiento específico (TCE; Fórmula 2) y mediante un análisis de regresión lineal se obtuvo la relación masa-longitud (RML).

En conjunto estos indicadores reflejan la variación en el incremento o disminución en el tiempo de la masa corporal respecto a la longitud del individuo y se relacionan directamente con el bienestar de los organismos, así como la influencia de la disponibilidad de alimento y los parámetros ambientales (Froese, 2006, Cifuentes *et al.*, 2012).

$$FC = 100 \left[ \frac{\text{masa final}}{[\text{longitud estándar}^3]} \right]$$

**Fórmula 1.** Factor de condición



$$TCE = 100 \left[ \frac{(\ln \text{ masa final}) - (\ln \text{ masa inicial})}{\text{tiempo}} \right]$$

**Fórmula 2.** Tasa de crecimiento específico

Para determinar el consumo de alimento, durante toda la fase experimental, se obtuvo el consumo diario de alimento, para cada una de las repeticiones (n=3) en cada tratamiento (CS, CL). Con estos datos se calculó el consumo total de alimento y el factor de conversión alimenticia (FCA; Fórmula 3).

$$FCA = \left[ \frac{\text{alimento consumido}}{(\text{masa final} - \text{masa inicial})} \right]$$

**Fórmula 3.** Factor de conversión alimenticia

En el caso de la supervivencia los valores se calcularon con base en la mortalidad registrada desde la fase de incubación hasta la finalización del experimento, para obtener la tasa de supervivencia (TS; Fórmula 4).

$$TS (\%) = 100 \left[ \frac{\text{organismos vivos}}{\text{total de organismos}} \right]$$

**Fórmula 4.** Tasa de supervivencia

Para obtener el grado de significancia entre tratamientos se realizaron análisis estadísticos con ayuda del programa GraphPad v.7.0 ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Para los datos biométricos y de consumo de alimento se realizaron pruebas de normalidad Kolmogorov-Smirnov's y la prueba de Bartlett para conocer la varianza entre los grupos. Para obtener la significancia entre los tratamientos se utilizó una prueba de t-student.

Para determinar las diferencias entre la relación masa-longitud se llevó a cabo un análisis de regresión lineal con una prueba posterior t-student. En el caso de los datos de supervivencia se analizaron con un test de Log-rank ( $X^2$  Mantel-Cox). El valor de significancia para todas las pruebas estadísticas antes descritas fue establecido al 95% de confianza ( $p \leq 0.05$ ).

### **3.2.3. Determinación de niveles de las hormonas circadianas: melatonina y cortisol**

Para la determinación de los niveles de la hormona melatonina se realizó un muestreo por cada tratamiento (CS y CL) a las 12 SPE en la mitad de la fase luminosa (12:00 pm) y en la mitad de la fase oscura (12:00am). Los organismos (n=8) fueron sedados en agua helada, posteriormente se colocaron en Nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta su análisis.

Las concentraciones de melatonina fueron determinadas con un kit comercial ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), diseñado para evaluar



la melatonina en plasma humano (IBL-RE54021) con las instrucciones del fabricante (<http://www.ibl-international.com/en/melatonin-elisa>). Para la determinación se realizaron las mediciones con el cuerpo del pez sin la presencia de ojos, con el fin de obtener las concentraciones de melatonina circulante en el organismo.

Para validar el uso del kit de melatonina en el cuerpo completo de pez blanco (*C. estor*) se utilizó una comparación de paralelismo en ensayos biológicos (Gottschalk y Dunn 2005). Por medio del método de regresión logística 5PL-1/y<sup>2</sup> (Fórmula 5) se obtuvieron los valores de densidad óptica máxima (OD Max 2.183) y mínima (OD Min 0.1835) así como los valores de concentración de melatonina de la curva estándar, los controles y las muestras de cuerpo de pez blanco con ayuda del programa de análisis de datos en línea (myassays.com), (Figura 15).

$$y = d + \frac{a - d}{\left[ 1 + \left( \frac{x}{c} \right)^b \right]^m}$$

a=OD min  
d= OD max

Fórmula 5. Regresión logística 5PL-1/y<sup>2</sup>.

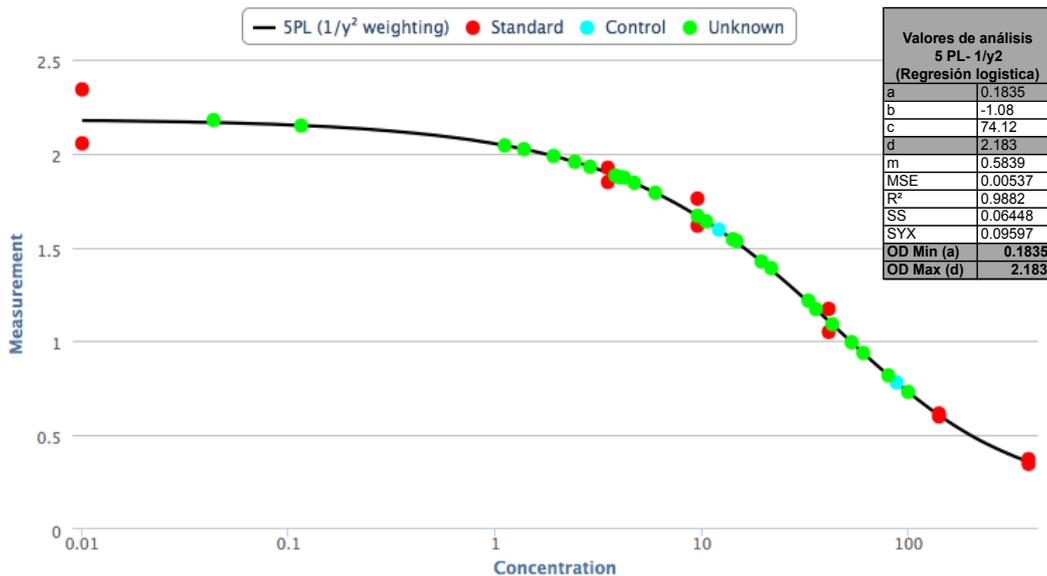


Figura 15. Concentraciones de melatonina con el análisis de regresión logística 5 PL-1/y<sup>2</sup>.

Posteriormente estos valores se utilizaron para llevar a cabo el análisis de regresión lineal Logit-Log (Fórmula 6), en el cuál se obtuvieron los valores de Logit-Log de la absorbancia y los valores logarítmicos de las diluciones relativas. Con estos datos se observó gráficamente el paralelismo entre las concentraciones de la curva estándar con respecto a diluciones de los valores de melatonina en las muestras del cuerpo de pez blanco. Finalmente se realizó una prueba de t-student entre las pendientes de ambas regresiones para comprobar el paralelismo estadístico (p ≥ 0.05) (Figura 16). Para establecer la

significancia de los niveles de melatonina en los tratamientos (CS y CL) se realizó una prueba t-student con valor de confiabilidad al 95% ( $p \leq 0.05$ ).

$$\text{Logit (OD)}_{fs} = \log \left( \frac{\text{OD} - \text{OD}_{\min}}{\text{OD}_{\max} - \text{OD}} \right)$$

Fórmula 6. Regresión logística Logit-log.

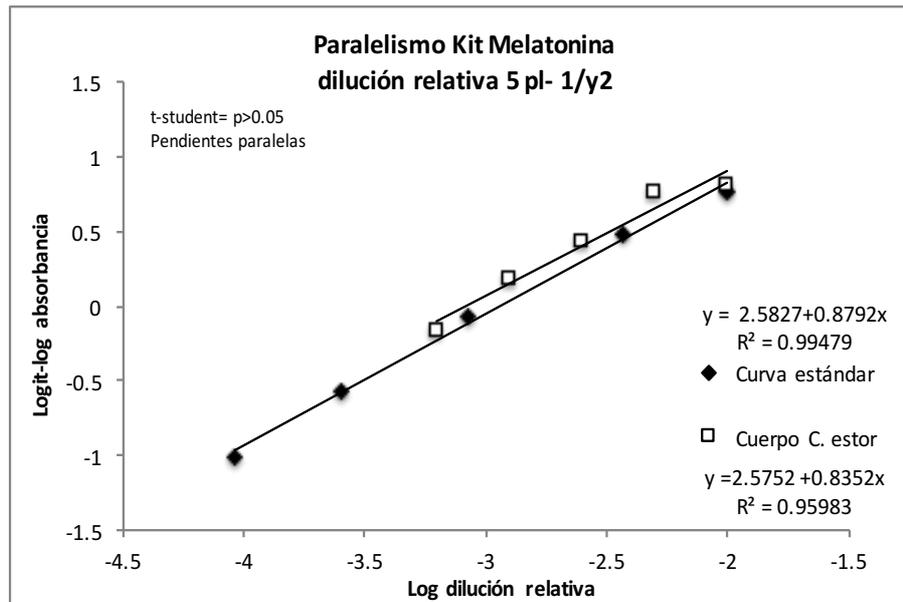


Figura 16. Paralelismo de la curva estándar del kit de melatonina (Curva estándar) y la dilución relativa de muestras de pez blanco (Cuerpo *C. estor*).

Para la determinación de los perfiles de cortisol se obtuvieron 63 organismos por cada tratamiento (CS y CL) en los puntos 9:00, 13:00, 17:00, 21:00, 1:00, 5:00 y 9:00 horas ( $n=9$ , en cada punto). Los organismos fueron mantenidos a  $-80^{\circ}\text{C}$ , hasta su análisis con el uso de un kit comercial para la determinación de cortisol en humanos (Cayman-Chemical, Cat. 500360) con las instrucciones del fabricante (<https://www.caymanchem.com/product/500360>), para este análisis los organismos fueron utilizados con vísceras sin la presencia de los ojos, con el fin de obtener las concentraciones de cortisol circulante en el cuerpo de *C. estor*.

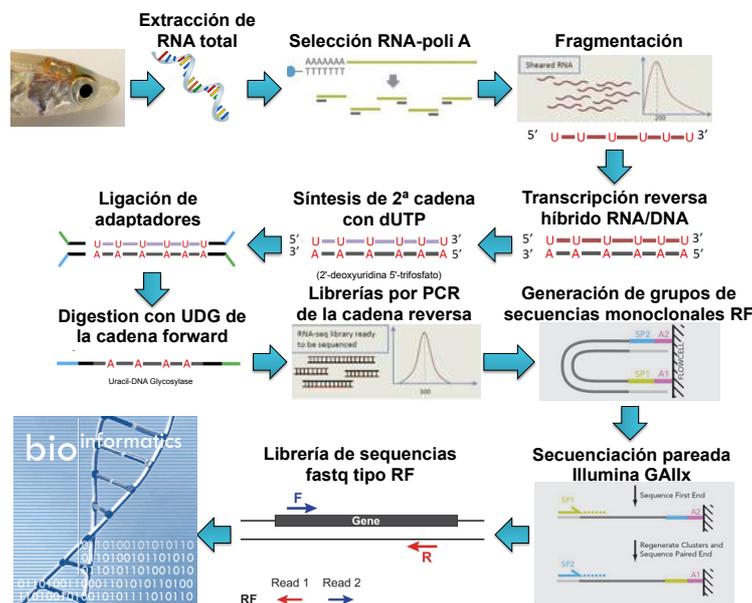
Cabe mencionar que para el caso de la prueba de cortisol ya se encuentra validado el kit comercial en muestras de pez blanco, por lo que no fue necesario hacer la prueba de paralelismo; para cuantificar los valores de la hormona cortisol se utilizó el método de regresión logística 4 PL (myassays.com) según instrucciones del fabricante. Para determinar la significancia de los puntos de muestreo entre los tratamientos se aplicó una prueba de t-student con un nivel de significancia menor o igual del 5% ( $p \leq 0.05$ ).

### 3.2.4. Análisis de expresión de genes por secuenciación masiva RNA-seq

#### 3.2.4.1. Secuenciación masiva RNA-seq

Para el análisis de expresión de genes por RNA-seq se obtuvieron 3 muestras de cada tratamiento (CS y CL), a las 12 SPE durante la fase lumínica (12:00 pm), los organismos fueron sedados con agua helada e inmediatamente después se colocaron en RNA<sub>later</sub> (Invitrogen, AM720) y se procesaron bajo las instrucciones del fabricante (<https://www.thermofisher.com>).

Consecutivamente se realizó la extracción de RNA a partir de las cabezas (n=3) de pez blanco de ambos tratamientos, con el kit comercial Gene jet RNA purification kit, bajo las instrucciones del fabricante (<https://www.thermofisher.com>). La pureza del RNA de cada muestra se determinó con un sistema automatizado de electroforesis Agilent 2100 Bioanalyzer (<http://www.genomics.agilent.com>). Posteriormente se realizaron las preparaciones de las librerías de RNA-seq, mediante la selección del RNA con presencia de Poli-Adenina en el extremo 3' a partir del RNA total extraído, mediante la selección del RNA con presencia Poli-Adenina en el extremo 3'. Después de realizar la fragmentación se efectuó una reacción de transcripción reversa y síntesis de segunda cadena con dUTP- terminal deoxinucleotidil-transferasa (Wang *et al.*, 2011) (Figura 17).



**Figura 17.** Secuencia de pasos para la preparación de librerías y secuenciación masiva de RNA-seq, a partir de RNA extraído de las cabezas de *C. estor*.

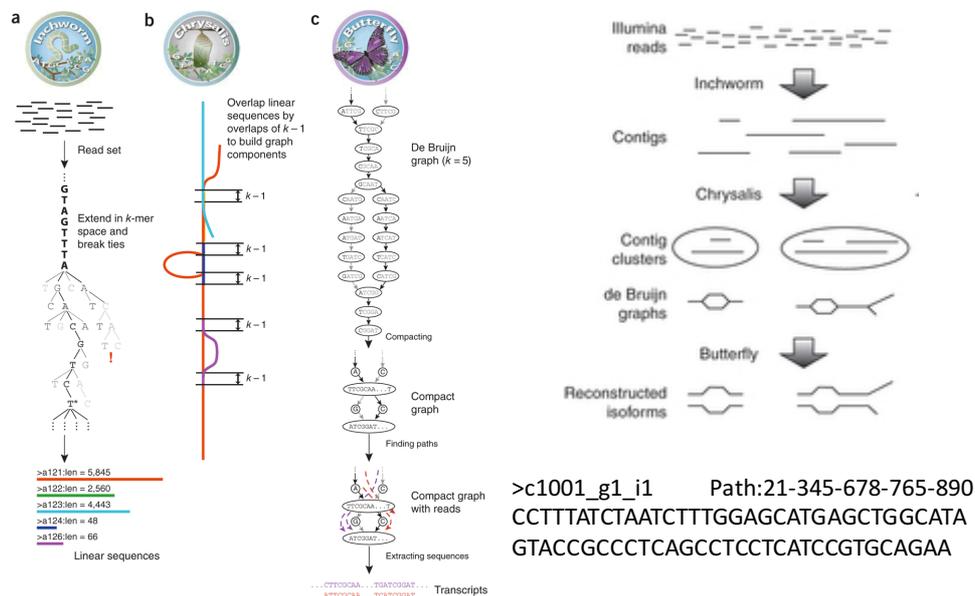
Posteriormente se realizó la ligación de adaptadores illumina y la digestión con UDG (Uracil DNA-Glicosilasa) de la cadena forward. Después se construyeron las librerías por PCR de la cadena reversa, se generaron los grupos de secuencias monoclonales Reverse-Forward (RF) (Wang *et al.*, 2011) y se

realizó la secuenciación pareada (lectura RF y lectura FR) en el secuenciador masivo Illumina-GAIIX, el cual puede tener un rendimiento de 85 Gigabases por corrida (Liu *et al.*, 2012). Al final se obtuvieron archivos en formato fastq tipo RF (Figura 17).

### 3.2.4.2. Procesos de ensamblaje y anotación funcional del transcriptoma *De Novo*

Una vez obtenidos los 6 archivos de lecturas fastq-RF (3 para LC y 3 para CS), se determinó la calidad de las lecturas con el programa Fast-QC, de acuerdo a los criterios descritos en Chen *et al.*, (2016). Posteriormente se realizó el ensamblaje de los transcritos por medio de un programa bioinformático especializado (Trinity), el cual es utilizado cuando se requiere ensamblar transcriptomas *De Novo* (Grabherr *et al.*, 2011; Hass *et al.*, 2013).

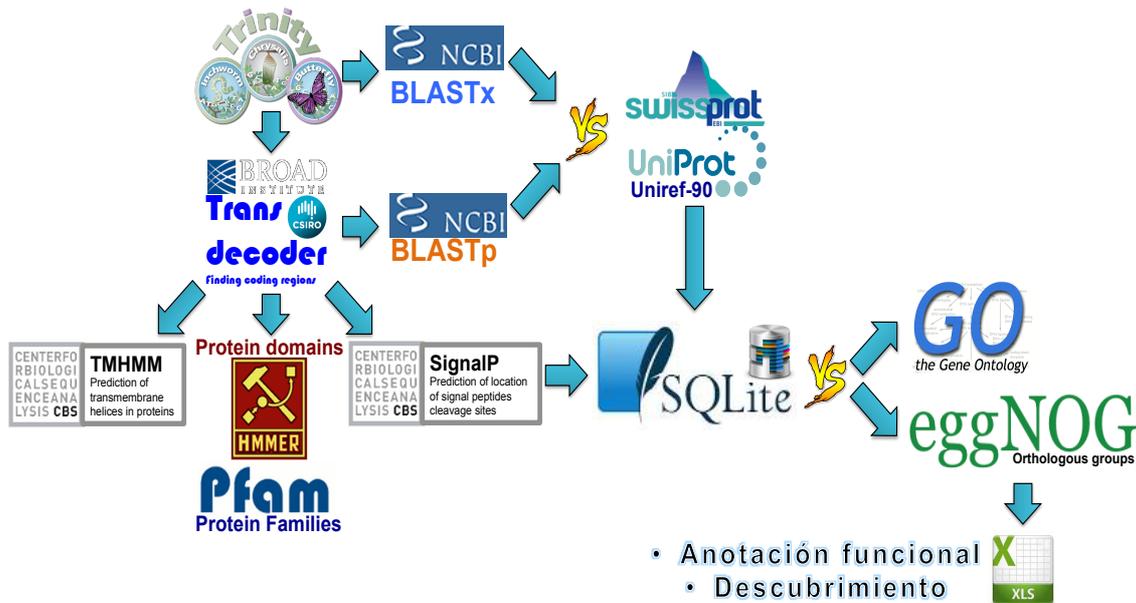
El programa Trinity funciona a partir de 3 algoritmos conocidos como: a) Orugas (el cual construye secuencias lineales “contigs” a partir de las lecturas fastq-RF, con la finalidad de aumentar el tamaño de palabra “*Kmer*”); b) Crisálidas (que sobre lapa las secuencias lineales “Cluster de contigs” *Kmer-1* para construir componentes gráficos); c) Mariposas (que construye y compacta la información en gráficas de Bruijn  $K=5$  para ensamblar las isoformas de los transcritos). Al final de los 3 algoritmos de Trinity se obtuvieron las secuencias ensambladas en archivos con formato fasta (Figura 18 y Tabla 2).



**Figura 18.** Algoritmos utilizados por el programa bioinformático Trinity a partir de las lecturas fastq-RF, para ensamblar los transcritos expresados en el pez blanco *C. estor*.

Después del proceso de ensamblaje se utilizaron una serie de programas bioinformáticos conocidos en conjunto como Trinotate (<https://trinotate.github.io/>), para realizar la traducción y la anotación funcional

de los transcritos. Esta parte del proceso permitió identificar los genes y las proteínas presuntamente expresadas, así como identificar transcritos no antes descritos en otros organismos (Figura 19). Inicialmente se emplearon herramientas de búsqueda por alineamiento local de bases, conocido como NCBI blastx (Basic Local Alignment Search Tool), el cual permite traducir los transcritos a proteínas e identificar su identidad por similitud de secuencias en las bases de datos mundiales (Altschul *et al.*, 1990).



**Figura 19.** Programas bioinformáticos y bases de datos para traducir transcritos, identificar y realizar la anotación funcional de proteínas a partir de los transcritos ensamblados en el pez blanco *C. estor*.

Paralelamente los datos obtenidos de Trinity fueron procesados por el programa Transdecoder (Tabla 2) el cual identifica las posibles regiones codificantes dentro de los transcritos (Hass *et al.*, 2013). Una vez obtenidas las secuencias proteicas se utilizaron las bases de datos de Swissprot (Bairoch *et al.*, 2000) y Uniref90-Uniprot (The uniprot consortium, 2008) para conocer las probables funciones biológicas de las proteínas en *C. estor* (Figura 19).

Las secuencias proteicas del Transdecoder fueron utilizadas para: 1) realizar la predicción de la topología de proteínas transmembranales, con el programa TMHMM (Krogh *et al.*, 2001); 2) buscar péptidos señal para regiones transmembranales, con el programa Signal P (Petersen *et al.*, 2011) y 3) la búsqueda de similitud de secuencias para dominios proteicos con el programa HMMER (Fin *et al.*, 2011), mediante la base de datos de familias de proteínas Pfam (Punta *et al.*, 2012) (Figura 19 y Tabla 2).

El conjunto de resultados fueron integrados en una base de datos tipo SQLite (<http://www.sqlite.org/>). Posteriormente se contrastaron los resultados obtenidos con la base de datos de ontología de genes GO (The Gene Ontology



consortium, 2013) así como la base de datos de grupos ortólogos EggnoG (Powell *et al.*, 2012) y COG (Tatusov *et al.*, 2003), para identificar y clasificar las posibles funciones de las proteínas presentes en *C. estor* (Figura 19).

**Tabla 2.** Principales procesos bioinformáticos utilizados para el análisis transcriptómico *De Novo* en el pez blanco *C. estor*.

Proceso	Programa	Algoritmos	Archivo de entrada	Archivo de salida
Ensamble de transcritos	Trinity	Orugas, Crisalidas, Mariposas	*.fastq	*.fasta
Predicción de regiones codificantes	Transdecoder	Modelo oculto de Markov	*.fasta	*.pep
Comparación de secuencias de proteínas	Blastx	Programación dinámica Smith-Waterman	*.fasta	*.txt
Comparación de secuencias de proteínas	Blastp	Programación dinámica Smith-Waterman	*.fasta	*.txt
Predicción de hélices transmembranales	TMHMM	Modelo oculto de Markov	*.pep	*.txt
Predicción de sitios de corte de péptidos señal	SignalP	Modelo oculto de Markov	*.pep	*.txt
Integración de base de datos	SQLite	Base de datos	*.txt	*.xls

### 3.2.4.3. Procesamiento e identificación de transcritos diferencialmente expresados

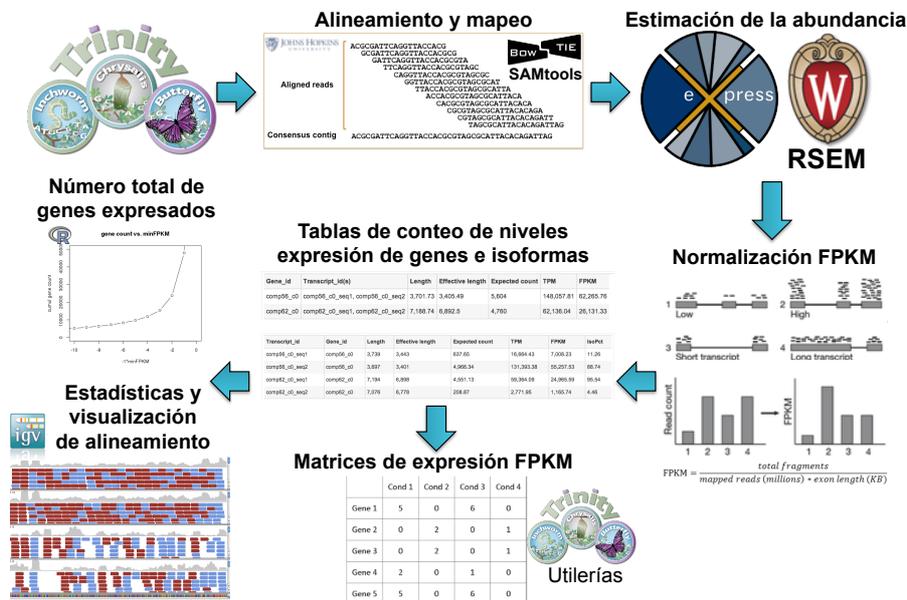
Los transcritos ensamblados con el programa bioinformático Trinity también fueron utilizados para realizar el análisis de expresión diferencial entre los tratamientos lumínicos CL y CS. Como primer paso se ejecutó el indizado, alineamiento y mapeo de los transcritos de cada muestra (n=6) vs el transcriptoma *De Novo* con ayuda del programa bioinformático Bowtie 2 (Li *et al.*, 2009) (Figura 20, Tabla 3).

Posteriormente se realizó la estimación de la abundancia de los transcritos en cada muestra (n=6), por medio de los programas bioinformáticos RSEM (Li y Dewey, 2011) y eXpress (Roberts y Pachter, 2013; Forster *et al.*, 2013) (Tabla 3), en los cuales se efectúa una normalización FPKM (Total de fragmentos del transcripto / millones de lecturas mapeadas por cada kilobase de longitud efectiva del transcripto) que permite obtener valores de expresión normalizados de acuerdo al número de lecturas obtenidas y la longitud de cada transcripto (Trapnell *et al.*, 2010) (Figura 20).

**Tabla 3.** Principales procesos bioinformáticos utilizados para la identificación de los transcritos diferencialmente expresados en el pez blanco *C. estor*.

Proceso	Programa	Algoritmos	Archivo de entrada	Archivo de salida
Ensamble de transcritos	Trinity	Orugas, Crisalidas, Mariposas	*.fastq	*.fasta
Indizado	Bowtie 2	Transfromada de Burrows –Wheeler (compresión por ordenación de bloques)	*.fasta/fastq	*.bwt2
Alineamiento y mapeo	Bowtie2	Programación dinámica (Needleman-Wunsch and Smith- Waterman)	*.fasta/fastq	*.sam
Conversión de SAM a BAM	Samtools BGZF	Compresión por bloque	*.sam	*.bam
Estimación de la abundancia de transcritos	RSEM/ eXpress	Esperanza-maximización	*.fastq/*.sam/ *.bam	*.txt/*.xprs

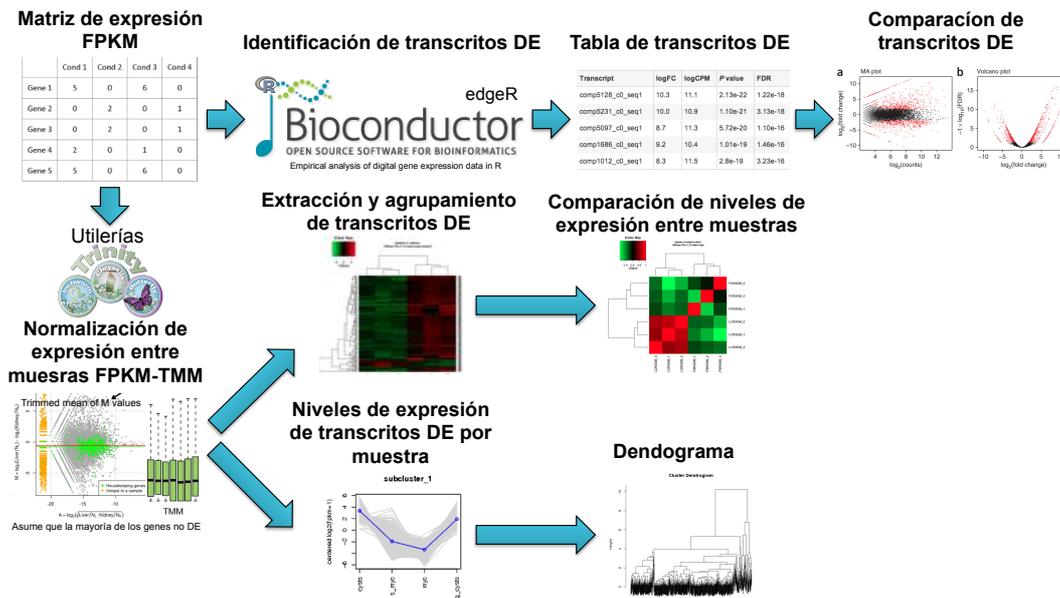
Una vez efectuada la normalización FPKM, se ejecutó el conteo de expresión de genes e isoformas y se obtuvieron las matrices de expresión FPKM, con el uso de utilerías del programa Trinity (Hass *et al.*, 2013). Además se obtuvieron gráficamente el número total de genes expresados, mediante el programa estadístico “R”, así como las estadísticas y visualización del alineamiento con el programa Integrative Genomics Viewer, IGV (Robinson *et al.*, 2011) (Figura 20).



**Figura 20.** Secuencia de pasos para la estimación de la abundancia y matrices de expresión FPKM de los transcritos del pez blanco *C. estor*.

Una vez obtenida la matriz de expresión FPKM se realizó la identificación de transcritos diferencialmente expresados por medio del paquete DEseq, en el programa “edgeR” de Bioconductor (Anders y Huber, 2010; Dillies *et al.*, 2013). A partir de este análisis se obtuvieron los transcritos diferencialmente expresados (DE) y se realizaron gráficas de comparación de los transcritos DE con ayuda del programa estadístico “R” (Figura 21). Paralelamente, con los valores de las matrices de expresión FPKM se ejecutó una normalización TMM (trimmed mean of M values), la cual representa la media truncada de las tasas logarítmicas de expresión y es utilizada para minimizar la dispersión de los datos (Robinson y Oshlack, 2010; Dillies *et al.*, 2013).

Una vez que se obtuvieron los datos normalizados FPKM-TMM, se realizaron “heat maps” con ayuda del programa “R”, para extraer y agrupar los transcritos DE, así como realizar la comparación y correlación de los niveles de expresión entre las muestras. Además, se obtuvieron los niveles de expresión de transcritos DE por cada muestra y un dendograma de expresión. Los transcritos que se identificaron como diferencialmente expresados DE fueron filtrados con una la línea de corte ( $p \leq 0.05$ ) con el método FDR (false discovery rate) y  $1 \log^2$  fold change (al menos el doble del número de conteos de cada transcripto) (Figura 21).



**Figura 21.** Pasos para la obtención de genes diferencialmente expresados (DE) a partir de las matrices de expresión FPKM de los transcritos del pez blanco *C. estor*.

### 3.2.4.4. Análisis de enriquecimiento e identificación de procesos biológicos y rutas metabólicas

Una vez obtenidos los análisis de Trinotate y la expresión diferencial de transcritos se realizó un análisis de enriquecimiento en términos de ontología de genes (Gene Ontology; GO), el cual identifica la función molecular, el

componente celular, ruta metabólica y el proceso biológico en el que está involucrado cada gen/proteína del transcriptoma *De Novo*, de acuerdo al sistema de clasificación Panther (The Gene Ontology Consortium, 2013) (Figura 22). Con ayuda de la base de datos Kegg (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), se llevó a cabo la identificación de los posibles procesos biológicos y rutas metabólicas relacionados con la expresión de genes/proteínas del transcriptoma *De Novo* (Kanehisa *et al.*, 2012) (Figura 22).



**Figura 22.** Resumen gráfico del proceso utilizado en el análisis transcriptómico *De Novo*, expresión diferencial, análisis de enriquecimiento e identificación de procesos biológicos y rutas metabólicas del pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*.

### 3.3. RESULTADOS

#### 3.3.1. Análisis biométricos de crecimiento, consumo de alimento y supervivencia

Para los análisis biométricos de crecimiento se realizaron en total 4 muestreos. El primero se realizó al momento de la eclosión y los tres muestreos posteriores se realizaron a las 4, 8 y 12 SPE. En el muestreo inicial ( $n=15$ ) no se encontró diferencias significativas entre los tratamientos para la longitud estándar y la masa ( $p \geq 0.05$ ). Sin embargo, para todos los muestreos subsiguientes ( $n=15$ ) a las 4, 8 y 12 SPE, si existieron diferencias significativas entre los tratamientos ( $p \leq 0.05$ ).

A las 12 SPE, se observó una diferencia final de 66.14% en la masa con valores promedio para CL de  $536.827 \pm 105.904$  mg y para CS de  $323.107 \pm 78.735$  mg (Tabla 4), en el caso de la longitud estándar se observa una diferencia del 17.95% con valores promedio de  $39.265 \pm 2.216$  mm para CL y  $33.288 \pm 2.458$  mm para CS (Tabla 4).



**Tabla 4.** Masa corporal (miligramos) y Longitud estándar (milímetros) de los organismos mantenidos en los fotoperiodos de luz continua (CL) y simulado control (CS) en los puntos de muestreo de 0, 4, 8 y 12 semanas post-eclosión (SPE).

		Masa (mg)			
		0 SPE	4 SPE	8 SPE	12 SPE
CL		1.632 ± 0.042 <sup>a</sup>	21.793 ± 6.052 <sup>a</sup>	189.36 ± 35.846 <sup>a</sup>	536.827 ± 105.904 <sup>a</sup>
CS		1.626 ± 0.045 <sup>a</sup>	9.1 ± 3.576 <sup>b</sup>	91.047 ± 32.423 <sup>b</sup>	323.107 ± 78.735 <sup>b</sup>
		Longitud estándar (mm)			
		0 SPE	4 SPE	8 SPE	12 SPE
CL		4.506 ± 0.303 <sup>a</sup>	14.669 ± 1.928 <sup>a</sup>	28.806 ± 1.795 <sup>a</sup>	39.265 ± 2.216 <sup>a</sup>
CS		4.473 ± 0.324 <sup>a</sup>	11.101 ± 1.856 <sup>b</sup>	22.229 ± 2.276 <sup>b</sup>	33.288 ± 2.458 <sup>b</sup>

Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los tratamientos.

El análisis del factor de condición indica que no existen diferencias significativas entre los tratamientos ( $p \geq 0.05$ ) a las 0, 4, 8 y 12 SPE (Tabla 5), lo que sugiere condiciones de bienestar en los organismos mantenidos en ambos tratamientos.

El cálculo de la tasa de crecimiento específico demuestra que existen diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los tratamientos a las 4, 8 y 12 SPE, lo que indica un mayor crecimiento en los organismos mantenidos en el fotoperiodo de luz continua (Tabla 5).

Por otro lado, los análisis del consumo de alimento y el factor de conversión alimenticia (FCA) indican diferencias significativas entre los fotoperiodos ( $p \leq 0.05$ ). Estos resultados sugieren que los organismos mantenidos en CL consumen una mayor cantidad de alimento (mg/día/organismo), pero que también, presentan una mejor conversión del alimento con respecto al tratamiento de CS (Tabla 5).

El análisis de regresión lineal de la relación masa-longitud (RML) indica que se presenta un crecimiento alométrico positivo ( $b > 3$ ) en ambos tratamientos, debido a que la pendiente ( $b$ ) presenta valores para CL de 3.2453 y para CS de 3.1761. Además, la prueba de comparación de las pendientes revela que no existen diferencias significativas entre ambos tratamientos ( $p \geq 0.05$ ) (Figura 23).

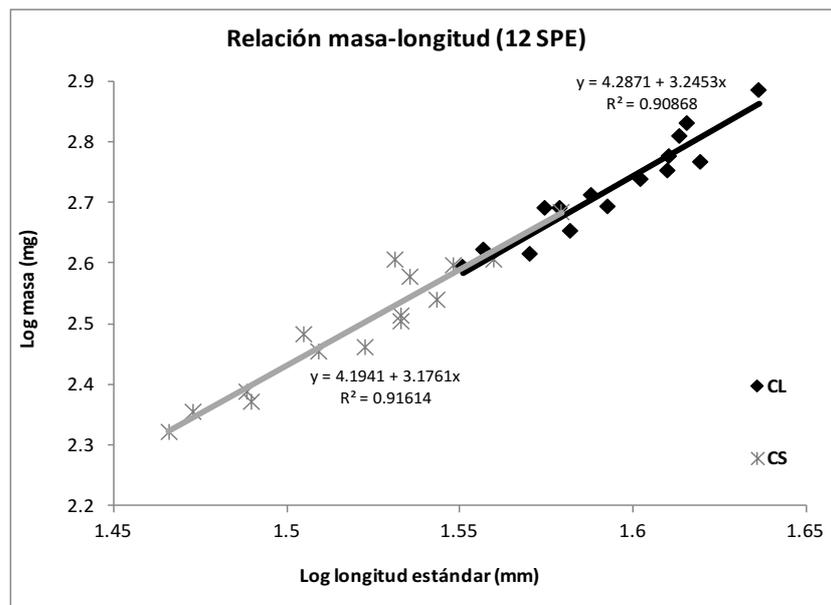
Los análisis demuestran que los modelos presentan coeficientes de determinación para CL de 0.9086 y para CS de 0.9161, por lo que ambos modelos de predicción tienen una confiabilidad cercana al 91%, adicionalmente los valores de los índices de correlación ( $r$ ) son de 0.9532 y 0.9572 para CL y CS respectivamente lo que demuestra un alto grado (95%) de correlación entre las variables de masa y la longitud, en la Figura 23 puede observarse las ecuaciones de la recta para ambos tratamientos.



**Tabla 5.** Factor de condición (K), Tasa de crecimiento específico (TCE), Consumo de alimento (mg/día/organismo) y Factor de conversión alimenticia (FCA) de los organismos en fotoperiodos de luz continua (CL) y simulado control (CS).

		Factor de condición (K)			
		0 SPL	4 SPL	8 SPL	12 SPL
CL		1.821 ± 0.326 <sup>a</sup>	0.701 ± 0.190 <sup>a</sup>	0.787 ± 0.082 <sup>a</sup>	0.877 ± 0.053 <sup>a</sup>
CS		1.860 ± 0.351 <sup>a</sup>	0.659 ± 0.185 <sup>a</sup>	0.754 ± 0.068 <sup>a</sup>	0.861 ± 0.065 <sup>a</sup>
		Tasa de crecimiento específico (TCE)			
		4 SPL	8 SPL	12 SPL	
CL		8.5 ± 0.9 <sup>a</sup>	7.9 ± 0.3 <sup>a</sup>	6.4 ± 0.2 <sup>a</sup>	
CS		5.5 ± 1.4 <sup>b</sup>	6.6 ± 0.6 <sup>b</sup>	5.8 ± 0.3 <sup>b</sup>	
		Consumo de alimento (mg/día/organismo)			Factor de conversión alimenticia (FCA)
		4 SPL	8 SPL	12 SPL	
CL		3.796 ± 0.949 <sup>a</sup>	7.235 ± 1.572 <sup>a</sup>	18.314 ± 4.035 <sup>a</sup>	1.618 ± 0.306 <sup>a</sup>
CS		2.720 ± 1.101 <sup>b</sup>	5.105 ± 1.788 <sup>b</sup>	12.985 ± 3.887 <sup>b</sup>	1.952 ± 0.486 <sup>b</sup>

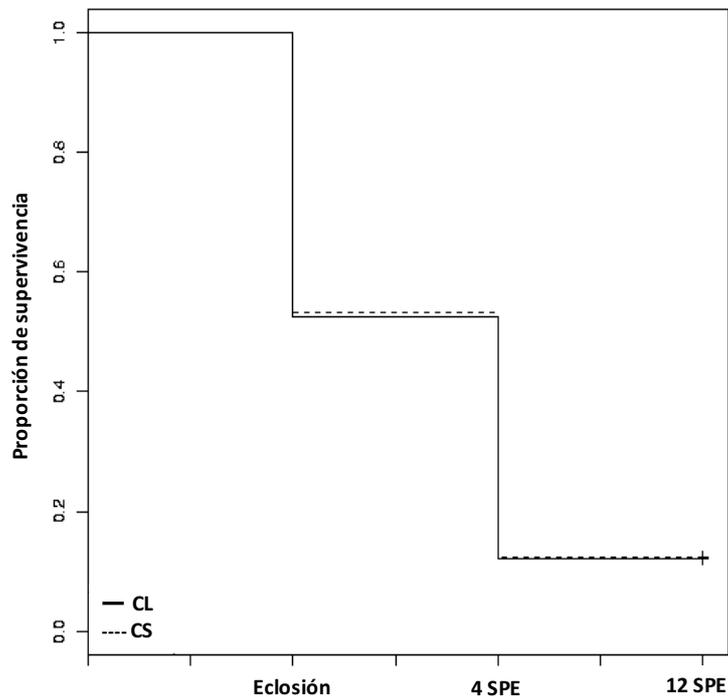
Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $p \leq 0.05$ ) para los puntos de muestreo de 0, 4, 8 y 12 semanas post-eclosión (SPE).



**Figura 23.** Relación masa-longitud (RML) de los organismos de los fotoperiodos de luz continua (CL) y simulado control (CS) a las 12 semanas post-eclosión (SPE).

El análisis de supervivencia ( $n=2,250$ ) muestra que entre el momento fertilización y la eclosión existe una mortalidad cercana al 53%, adicionalmente indica que otro evento importante en el descenso de la población ocurre entre la eclosión y las 4 SPE con un valor de mortalidad cercano al 35% para ambos tratamientos. El análisis muestra también una supervivencia final de 12.00% para CL y 12.44% para CS, sin diferencias significativas entre los tratamientos ( $p \geq 0.05$ ). En conjunto estos resultados sugieren que el tratamiento de luz continua no afecta de manera significativa la supervivencia de los organismos durante la fase experimental (Figura 24).

## Curva de supervivencia



**Figura 24.** Análisis de supervivencia de los organismos en fotoperiodos de luz continua (CL) y simulado control (CS) al momento de la eclosión, 4 y 12 semanas post-eclosión (SPE).

Resulta importante mencionar que durante el experimento se observó mayor presencia de deformaciones músculo-esqueléticas en el opérculo, la mandíbula y en la columna vertebral (probable cifolordosis), en el tratamiento de luz continua, una con una recurrencia de un 10.3 % en CL vs 1.13 % en CS. El análisis estadístico de  $X^2$  indica diferencias significativas entre los tratamientos ( $p \leq 0.05$ ) (Figura 25).



**Figura 25.** Fenotipos observados en el tratamiento de luz continua (CL) a las 12 semanas post-eclosión (SPE). a) organismo con presencia de deformidades músculo-esqueléticas; b) organismo sin presencia de deformidades.



### 3.3.2. Determinación del nivel de las hormonas circadianas: melatonina y cortisol

En la Tabla 6 se muestran los valores de las concentraciones de melatonina obtenidas para ambos tratamientos (CS y CL) en los puntos de muestreo (12:00 pm y 12:00 am), sin observarse diferencias significativas entre los mismos ( $p \geq 0.05$ ). Estos resultados sugieren que a pesar de que el kit de detección de melatonina fue validado con la prueba de paralelismo en ensayos biológicos; y se realizaron pruebas exhaustivas para la determinación de esta hormona circadiana. No se lograron resultados confiables en los niveles de la hormona con los organismos muestreados ( $n=8$ ) ya que no se encontró el pico reportado de esta hormona en la fase nocturna. Se debe de estandarizar un método alternativo para la determinación de melatonina en el cuerpo completo de pez blanco *C. estor* con el fin de confirmar o descartar los resultados presentados en este trabajo.

**Tabla 6.** Concentración de melatonina de los organismos en fotoperiodos de luz continua (CL) y simulado control (CS) de 12 semanas post-eclosión (SPE). La concentración es expresada en picogramos de melatonina  $\text{mg}^{-1}$  de masa ( $\text{pg mg}^{-1}$  masa).

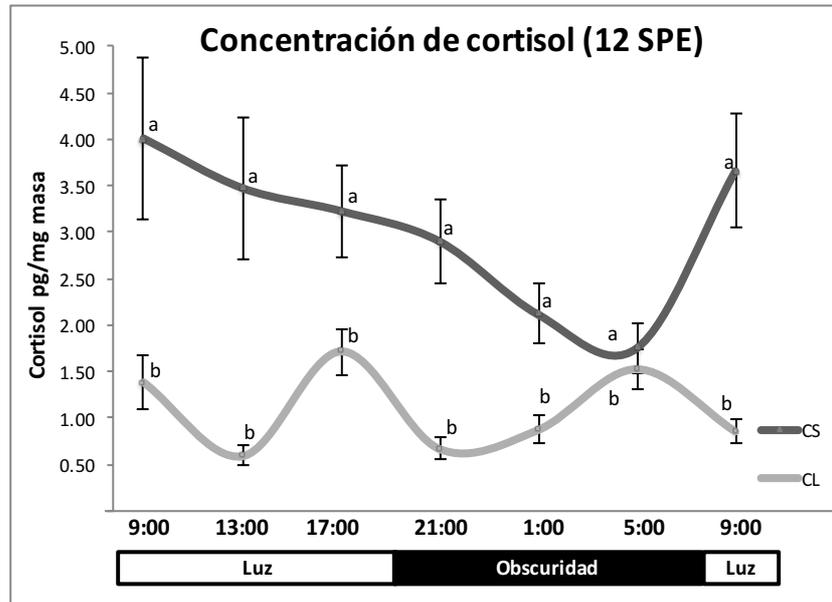
Concentración de Melatonina ( $\text{pg/mg}$ de masa)		
	12:00 p.m.	12:00 a.m.
CL	$0.678 \pm 0.298^a$	$0.554 \pm 0.258^a$
CS	$0.465 \pm 0.288^a$	$0.513 \pm 0.373^a$

Letras diferentes indican diferencias significativas entre los puntos de muestreo de los tratamientos ( $p \geq 0.05$ ).

Por otro lado, el ensayo (ELISA) de cortisol indica que en el tratamiento de CS existe una sola acrofase alrededor de las 9:00 horas y una sola batifase alrededor de las 5:00 horas, con valores de  $4.06 \pm 0.878$  y  $1.756 \pm 0.269$  picogramos de cortisol  $\text{mg}^{-1}$  de masa respectivamente (Figura 26), cabe mencionar que la acrofase presenta una relación con el inicio de la fase luminosa, lo que sugiere un ciclo circadiano típico de organismos diurnos para *C. estor*.

En los peces mantenidos bajo condiciones de luz continua se observan tres puntos de acrofase a las 9:00, 17:00 y 5:00 horas con valores de  $1.380 \pm 0.284$ ,  $1.710 \pm 0.245$  y  $1.520 \pm 0.208$   $\text{pg mg}^{-1}$  de cortisol respectivamente, así como tres puntos de batifase a las 13:00, 21:00 y 9:00 horas con valores de  $0.592 \pm 0.106$ ,  $0.669 \pm 0.114$  y  $0.855 \pm 0.135$   $\text{pg mg}^{-1}$  de cortisol respectivamente, lo que sugiere un descontrol en el ritmo circadiano de cortisol para estos organismos.

En conjunto el análisis demuestra que los perfiles circadianos presentan diferencias significativas entre los tratamientos de CL y CS ( $p \leq 0.05$ ), en la Figura 26 se observan los diferentes perfiles de la hormona circadiana de cortisol a través del muestreo de 24 horas.

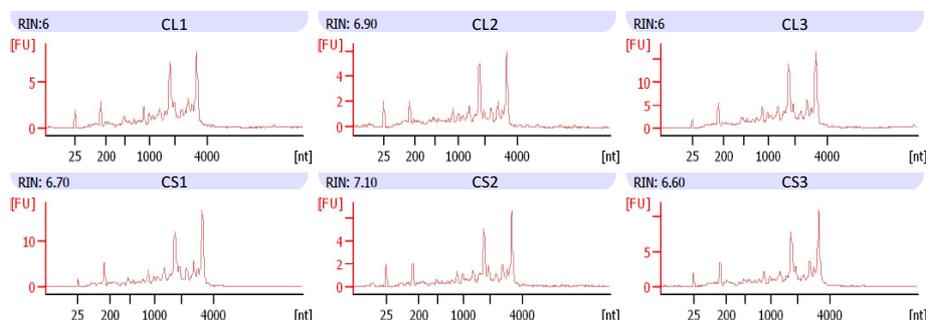


**Figura 26.** Concentración de la hormona circadiana de cortisol de los organismos en fotoperiodos de luz continua (CL) y simulado control (CS) de 12 semanas post-eclosión (SPE). La concentración es expresada en picogramos de cortisol  $\text{mg}^{-1}$  de masa ( $\text{pg} \cdot \text{mg}^{-1}$  masa) durante un lapso de 24 horas, letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los puntos de muestreo de los tratamientos.

### 3.3.3. Análisis de expresión de genes por secuenciación masiva RNA-seq

#### 3.3.3.1. Ensamble y anotación funcional del transcriptoma *De Novo*

Las muestras de RNA de las cabezas de peces blancos de ambos tratamientos ( $n=6$ ), obtuvieron valores de RIN (RNA integrity number) entre 6 y 6.90 para los organismos de luz continua, así como valores entre 6.6 y 7.1 para las muestras del fotoperiodo simulado control (Figura 27). Estos resultados indican una integridad aceptable del RNA para realizar el análisis de expresión de genes con la plataforma de secuenciación masiva Illumina GAIIx.



**Figura 27.** Electroferograma de RNA extraído de cabezas del pez blanco (*C. estor*) utilizados para secuenciación masiva RNAseq, (CL= Luz continua; CS= Fotoperiodo simulado control).



De las 6 muestras de los tratamientos de CL y CS, se obtuvieron 153,867,398 lecturas de alta calidad (mean phred quality score= 38-39), a partir de 11,078,452,656 (11 Gb) de bases secuenciadas en la plataforma de Illumina.

El ensamble transcriptómico *De Novo* realizado con el programa Trinity, obtuvo un total de 62,337,925 bases ensambladas en 79,190 transcritos totales. La longitud promedio de los transcritos fue de 787.19 pb, con un N50 de 1,324 pb (al menos el 50% del total de los transcritos contienen 1,324 pb), un porcentaje de GC (Guanina-Citosina) de 49.54 % y con una cobertura estimada de secuenciación de 177.71 X. El ensamble fue registrado en la base de datos de NCBI con el bioproject titulado “*Menidia estor* Transcriptome” PRJNA401428.

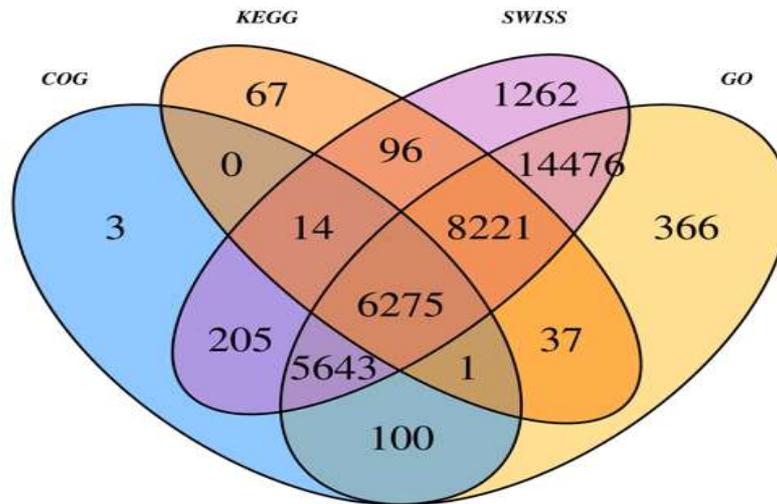
Una vez caracterizado el transcriptoma *De Novo*, se realizó un alineamiento de las secuencias de cada muestra. Se obtuvieron entre ~14 a ~34 millones de lecturas para cada muestra individual, las cuales fueron mapeadas vs el ensamble *De Novo*. Los datos indican un porcentaje de mapeo entre el 92.03-93.37 % y con un porcentaje de lecturas pareadas correctamente (RF-FR) del 88.98-90.91 %, y un porcentaje de lecturas aisladas del 1.74 al 2.17%. Los valores estadísticos indican que las lecturas individuales por cada muestra secuenciada se encuentran dentro del ensamble realizado, los detalles de alineamiento para cada muestra individual pueden observarse en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Estadística de alineamiento de muestras vs ensamble *De Novo* para el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*. RF (Reverse-Forward), FR (Forward-Reverse).

Estadística de alineamiento vs ensamble <i>De Novo</i>					
Tratamiento	Muestra	Total de lecturas	% de lecturas mapeadas	% de lecturas pareadas correctamente (RF-FR)	% lecturas aisladas
CS	A	22256718	93.37	90.91	1.74
	B	28036184	92.32	89.54	1.94
	C	34641628	92.03	88.98	2.17
CL	A	27514802	92.7	90.1	2.02
	B	14982452	92.67	89.23	2.2
	C	26435614	92.15	89.53	1.96

El programa Trinity además identificó 70,423 genes putativos, con 68,960 contigs únicos, los cuales se anotaron funcionalmente en 43,314 proteínas totales con las bases de datos EggNog (4,692), Uniprot (7,057), Swiss prot (36,192), GO (35,119), Kegg (14,711) y COG (12,241) (Figura 28).

Con el programa BLAST, que utiliza la base de datos de NCBI se logró identificar la homología de secuencias con las de diversas especies pertenecientes a múltiples taxa, entre los que destacan los géneros Homo (~13,500), Mus (~8,000), Danio (~5,000), Ratus (~2,500), Bos (~2,000), Gallus (~1,800) y Xenopus (~1,500).

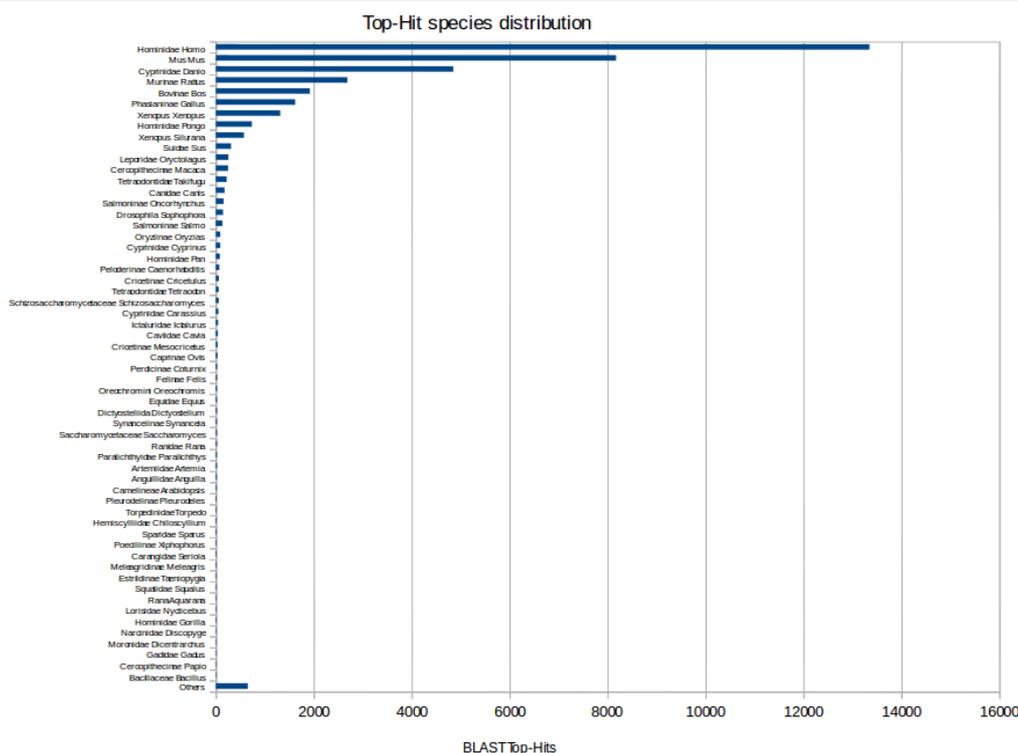


**Figura 28.** Diagrama de Venn de los transcritos anotados en el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*. Bases de datos Swiss-prot, GO (Gene ontology), Kegg (Enciclopedia de genes y genomas de Kioto) y COG (Cluster de grupos ortólogos).

De manera interesante se observa una multiplicidad de secuencias relacionadas directamente con las informadas en otros géneros de peces como Takifugu, Oncorhynchus, Salmo, Oryzias, Cyprinus, Tetraodon, Carasius, Ictalurus, Oreochromis, Synanceia, Paralichthys, Anguilla, Torpedo, Chiloscylidium, Sparus, Xiphophorus, Seriola, Squalus, Discopyge, Dicentrarchus y Gadus.

Estos resultados sugieren que existe una alta correlación entre los diversos géneros de peces con las secuencias encontradas en el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*. Sin embargo, también es evidente que las secuencias de peces en la base de datos es limitada, debido a que las más altas frecuencias de distribución son con secuencias de otras especies de vertebrados (Figura 29).

El análisis de expresión normalizada realizado con el programa RSEM, indica que de los 70, 423 transcritos ensamblados, en cada muestra analizada existen entre un 42.43-52.45% de transcritos con niveles de expresión de al menos 1 FPKM, esto significa que alrededor del 50% por ciento de los genes cuentan con índices de expresión mayores a 1 FPKM, por lo que se encuentran representados estadísticamente en el ensamble transcriptómico realizado (Tabla 8).



**Figura 29.** Diagrama de distribución de transcritos anotados para el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor* de acuerdo al género de otras especies de la base de datos de BLAST-NCBI.

**Tabla 8.** Expresión normalizada de transcritos para el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*.

Expresión normalizada de transcritos RSEM				
Tratamiento	Muestra	Total	Total con al menos	Porcentaje
		ensamblado	1 FPKM	
CS	A	70423	35559	50.49
	B		36939	52.45
	C		34140	48.48
CL	A		32357	45.95
	B		29878	42.43
	C		33280	47.26

FPKM (Total de fragmentos del transcritos / millones de lecturas mapeadas por cada kilobase de longitud efectiva del transcritos).

Por otro lado, los transcritos identificados como genes funcionales fueron clasificados en tres categorías, de acuerdo al análisis de enriquecimiento en términos de GO (Gene Ontology), basado en la homología de secuencias. La primer categoría es la de procesos biológicos, en la que se obtuvieron 126,929 términos, donde los grupos mayoritarios fueron procesos celulares (16%) y metabólicos (11%), regulación biológica (11%), pigmentación (10%), procesos de organismos multicelulares (8%) y de desarrollo (7%), localización (6%) y respuesta a estímulos (5%) (Figura 30).

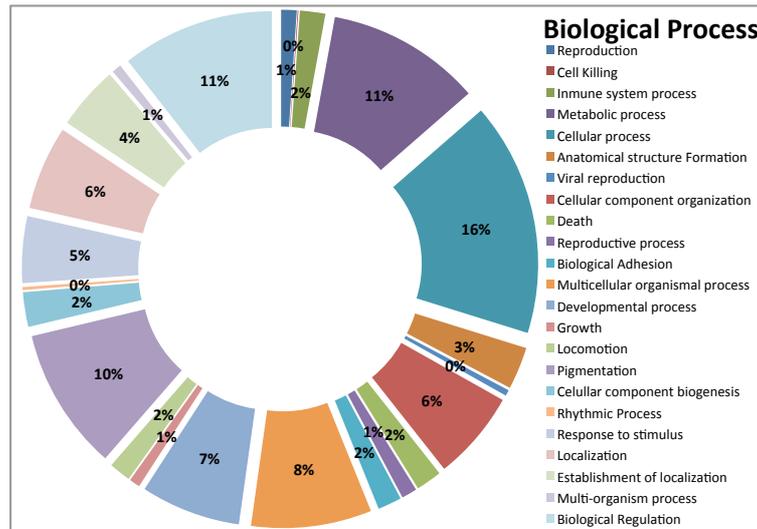


Figura 30. Diagrama porcentual de los procesos biológicos identificados en el análisis de enriquecimiento en términos de GO para el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*.

La segunda categoría es la de función molecular. En esta se identificaron 36,670 términos, con los grupos mayoritarios de unión (49%), actividad catalítica (25%), actividad molecular de transducción (7%), actividad de transporte (6%), actividad de regulación de transcripción (5%) y actividad de regulación enzimática (5%) (Figura 31).

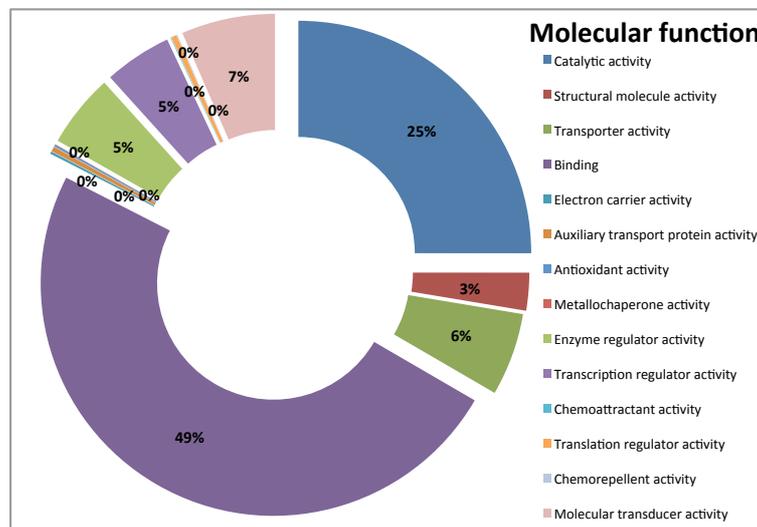
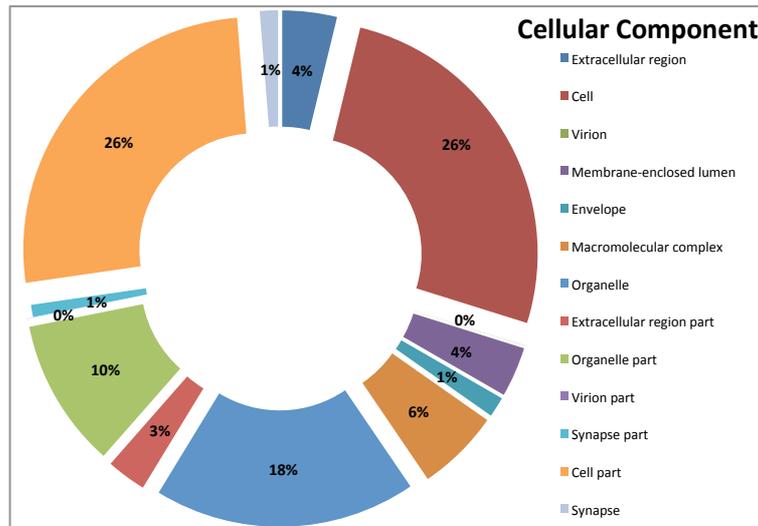


Figura 31. Diagrama porcentual de las funciones moleculares identificadas en el análisis de enriquecimiento en términos de GO para el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*.

En la tercera categoría de componentes celulares se identificaron 98,712 términos, de los cuales los grupos mayoritarios corresponden a la región celular (26%) o parte celular (26%), el 18% a orgánulos, el 10% a parte de orgánulos y el 6% a procesos macromoleculares (Figura 32).

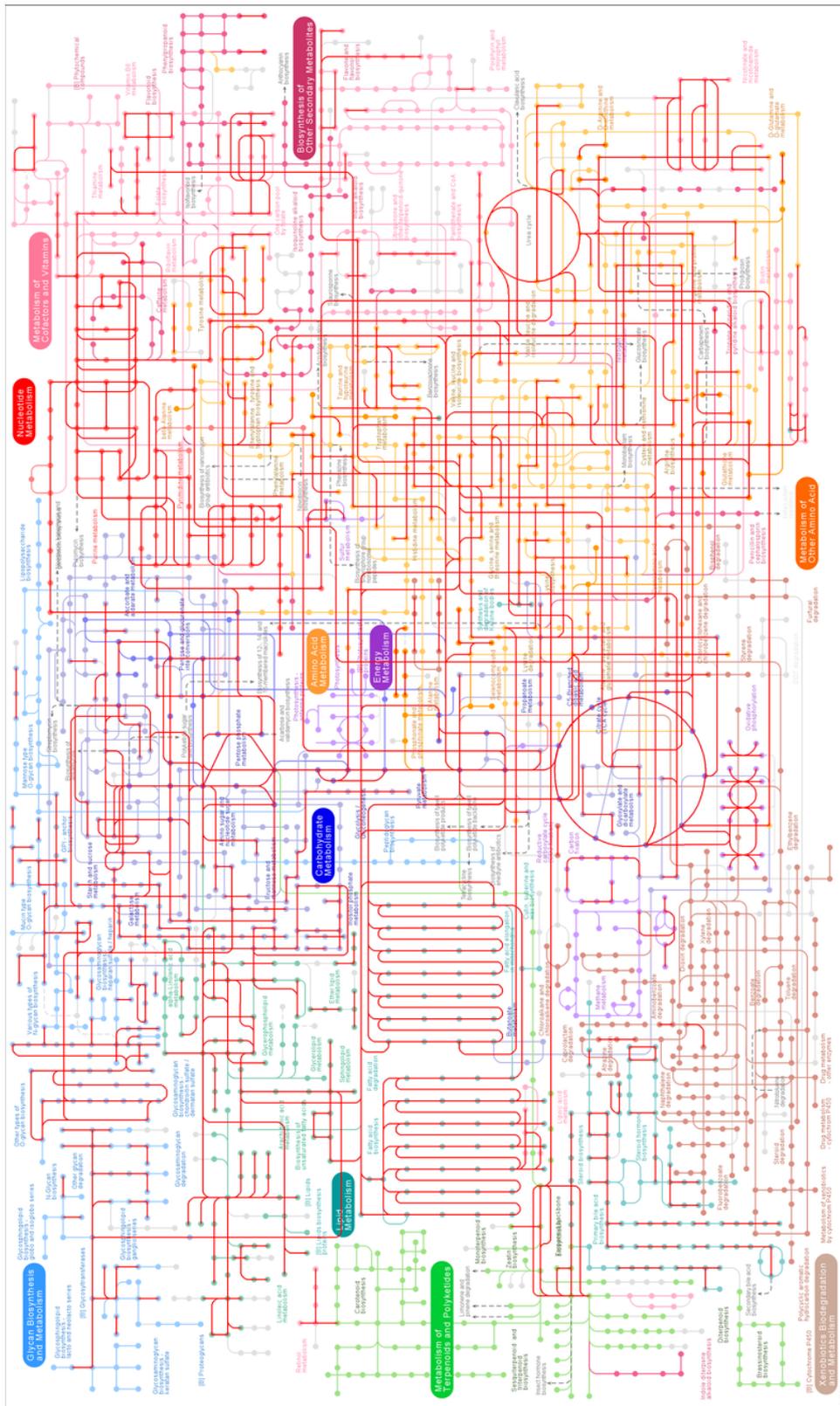


**Figura 32.** Diagrama porcentual de los componentes celulares identificados en el análisis de enriquecimiento en términos de GO para el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*.

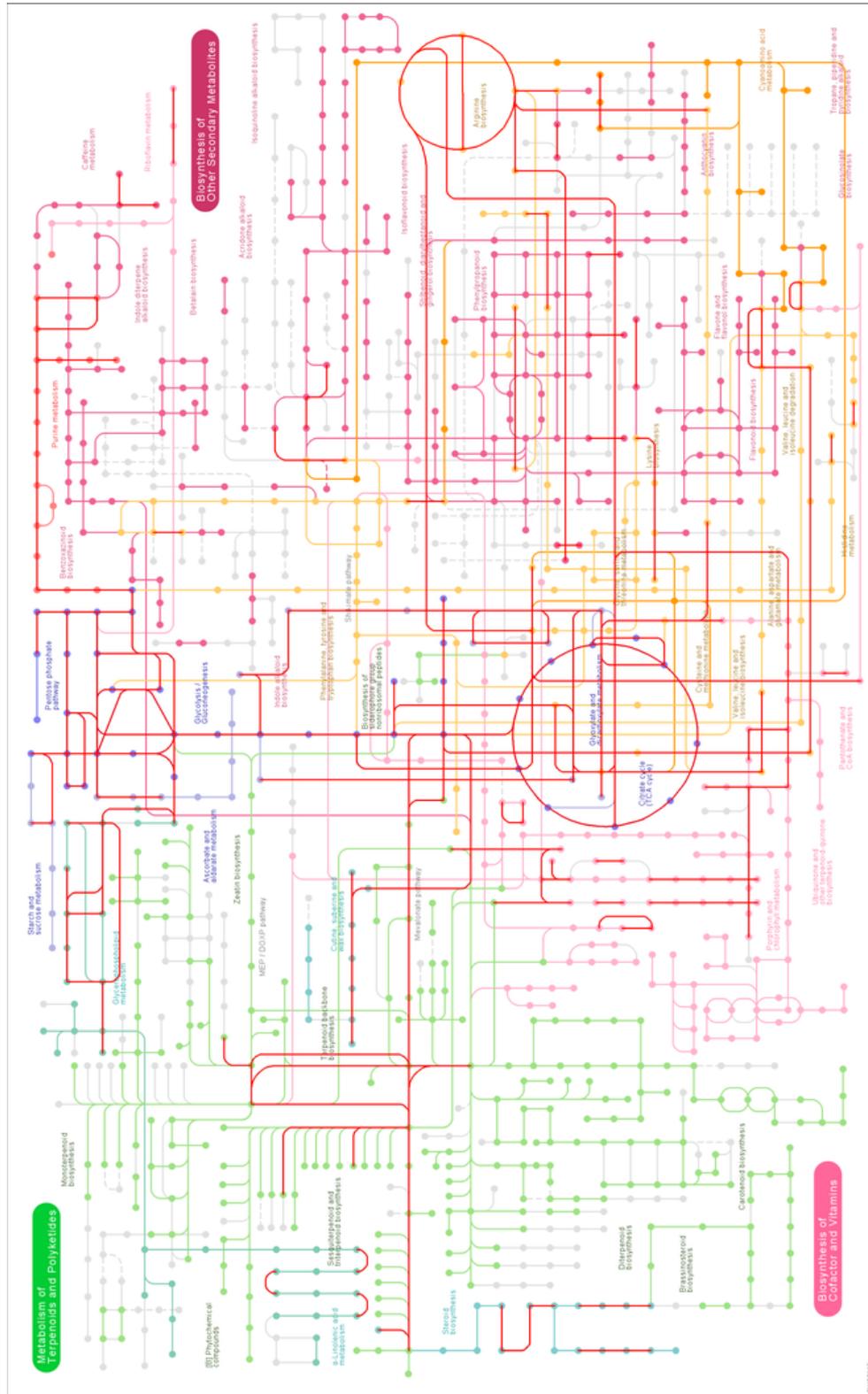
Con la anotación de los transcritos en comparación con la base de datos de Kegg se identificaron 791 anotaciones en rutas metabólicas primarias (Figura 33) y 224 anotaciones en rutas metabólicas secundarias (Figura 34). Entre las rutas metabólicas primarias identificadas destacan el ciclo del ácido tricarboxílico, la ruta de fosforilación oxidativa, el metabolismo de glutatión, de nicotinamida/nicotina, de cofactores/vitaminas, taurina, de purinas/pirimidinas, de la pentosa fosfato, carbohidratos y lípidos. De manera interesante el análisis reporta una baja cantidad de transcritos relacionados con el metabolismo de terpenoides (lípidos derivados de cinco carbonos) y poliQUÉTIDOS (derivados de la descarboxilación de malonil-CoA), así como los de la ruta de biodegradación y metabolismo de xenobióticos, lo que sugiere una baja actividad de estas rutas para las muestras de *C. estor* utilizadas (Figura 33).

Además, se identificaron 383 procesos biológicos en la base de datos de Kegg. Entre los más destacados encontramos la ruta relacionada con cáncer (241 anotaciones), la ruta PI3K-Akt (168), endocitosis (148), ruta de MAPK (134), transporte de RNA (123), procesamiento de proteínas en retículo endoplásmico (121), metabolismo de purinas (117), ruta Rap1 (116), ruta Ras (112), Proteólisis por ubiquitinación (109), micro RNAs en cáncer (103), regulación circadiana (41), ritmo circadiano (20) y fototransducción (14), entre otros.

La clasificación de las secuencias relacionadas a procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares, así como a las diversas anotaciones metabólicas y biológicas, ofrecen la identificación plena de los genes/proteínas relacionados con diversos procesos biológicos, en conjunto con las estadísticas del ensamble *De Novo* y de alineamiento, la información del transcriptoma obtenido puede servir de base para abordar una gran variedad de preguntas biológicas en *C. estor*, mediante el uso de las herramientas moleculares generadas.



**Figura 33.** Diagrama de las rutas metabólicas primarias identificadas respecto a la base de datos de Kegg para el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*. Las líneas en color rojo muestran las rutas metabólicas identificadas.

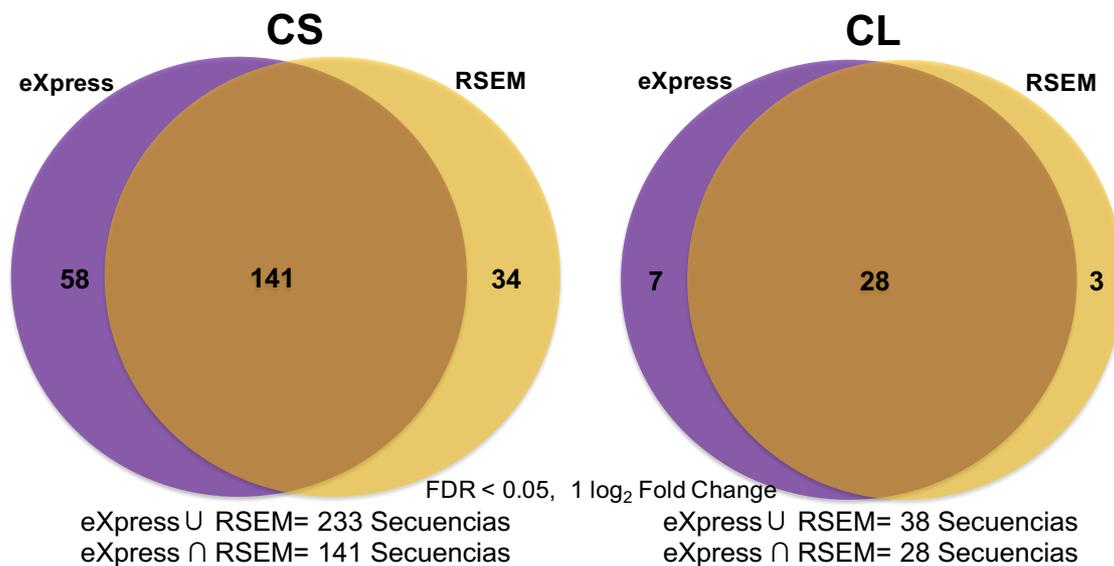


**Figura 34.** Diagrama de las rutas metabólicas secundarias identificadas respecto a la base de datos de Kegg para el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*. Las líneas en color rojo muestran las rutas metabólicas identificadas.



### 3.3.3.2. Análisis y anotación de transcritos diferencialmente expresados

Para identificar los transcritos diferencialmente expresados entre los tratamientos se utilizaron los programas de estimación de la abundancia de transcritos RSEM y eXpress con valores de corte de  $FDR \leq 0.05$  y  $1 \log_2 FC$ , en el caso de RSEM se identificaron 175 transcritos de alta expresión en el tratamiento de fotoperiodo simulado control (CS) y 31 transcritos de alta expresión en el tratamiento de luz continua (CL), con el método de eXpress se identificaron 199 transcritos de alta expresión en el tratamiento de CS y 35 transcritos en el tratamiento de CL (Figura 35).



**Figura 35.** Diagrama de Venn de los transcritos diferencialmente expresados con los programa RSEM y eXpress para el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*. CL (Fotoperiodo de luz continua); CS (Fotoperiodo simulado control); FDR (False discovery rate).

Debido a que cada método identifica diferentes transcritos altamente expresados entre los tratamientos, se utilizaron únicamente los que se encontraron en la intersección de ambos métodos, para continuar con el análisis de expresión diferencial. Por lo tanto se utilizaron 141 y 28 transcritos de alta expresión para el tratamiento de CS y CL respectivamente, como se muestra en la intersección de la Figura 35. Con los transcritos ubicados en la intersección se realizó una tabla que muestra los valores de expresión diferencial de los transcritos bajo el método de RSEM y eXpress, en la Tabla 9 se observan los valores para los 28 transcritos de alta expresión en el tratamiento de luz continua (CL).

En la Tabla 10 se observan los valores para 141 transcritos de alta expresión en el fotoperiodo simulado control (CS), estos datos indican la coincidencia de ambos métodos para identificar los transcritos diferencialmente expresados entre los tratamientos.

**Tabla 9.** Valores de expresión diferencial de los transcritos de alta expresión en el fotoperiodo de luz continua (CL) para el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*.

Valores de expresión diferencial de los transcritos de alta expresión en el tratamiento de CL							
No	Contig	RSEM			eXpress		
		log2FC	FDR	PValue	log2FC	FDR	PValue
1	c13523_g1	1.26	8.0E-03	2.0E-05	1.24	9.9E-03	2.5E-05
2	c13836_g2	2.12	1.6E-04	1.6E-07	2.06	2.7E-04	2.3E-07
3	c14070_g1	1.73	1.7E-04	1.8E-07	1.84	8.3E-05	3.9E-08
4	c17493_g1	2.18	1.7E-04	1.8E-07	2.19	8.2E-04	9.6E-07
5	c18738_g1	3.18	2.6E-02	9.6E-05	2.86	2.2E-02	7.0E-05
6	c18798_g1	1.23	1.2E-02	3.2E-05	1.32	4.3E-03	8.1E-06
7	c20007_g1	2.67	2.8E-02	1.1E-04	2.64	1.0E-02	2.7E-05
8	c20024_g2	1.76	1.6E-04	1.5E-07	1.69	6.4E-04	6.9E-07
9	c22274_g1	2.43	4.9E-02	2.4E-04	2.72	1.1E-02	3.0E-05
10	c23901_g1	1.29	1.6E-02	4.9E-05	1.38	5.8E-03	1.2E-05
11	c24038_g1	1.87	1.2E-04	1.0E-07	1.81	2.7E-04	2.3E-07
12	c26096_g2	1.82	1.2E-02	3.6E-05	1.88	8.8E-03	2.1E-05
13	c28446_g1	1.56	2.5E-04	2.9E-07	1.64	1.3E-04	8.5E-08
14	c28725_g1	1.17	4.0E-02	1.9E-04	1.20	3.3E-02	1.4E-04
15	c30410_g1	1.62	4.2E-02	2.1E-04	1.65	2.9E-02	1.1E-04
16	c30547_g1	1.42	5.2E-03	1.1E-05	1.33	1.0E-02	2.6E-05
17	c30755_g1	1.39	6.4E-03	1.5E-05	1.24	1.4E-02	4.0E-05
18	c31663_g1	1.35	1.2E-02	3.2E-05	1.45	2.1E-03	3.2E-06
19	c31946_g1	2.89	1.6E-02	5.2E-05	2.89	1.7E-02	5.3E-05
20	c36737_g1	1.48	4.2E-02	2.1E-04	1.51	4.3E-02	2.2E-04
21	c36859_g1	1.74	2.2E-04	2.3E-07	1.73	2.6E-04	2.0E-07
22	c4014_g1	2.05	7.3E-05	4.8E-08	2.04	2.2E-04	1.5E-07
23	c45592_g1	2.03	2.6E-03	4.5E-06	1.76	2.3E-03	3.5E-06
24	c53222_g1	1.13	2.9E-02	1.2E-04	1.14	4.2E-02	2.1E-04
25	c53925_g1	3.07	1.0E-03	1.5E-06	3.12	8.9E-04	1.1E-06
26	c57314_g1	1.26	4.0E-02	1.9E-04	1.28	3.9E-02	1.8E-04
27	c58709_g1	1.34	2.8E-02	1.0E-04	1.36	2.2E-02	7.4E-05
28	c6356_g1	1.59	1.2E-04	1.1E-07	1.55	2.7E-04	2.2E-07

Contig (Identificador de transcripto); log2FC (Cambio del nivel de expresión en logaritmo en base 2), valores positivos indican alta expresión en el tratamiento de CL; FDR (False discovery rate); PValue (Valor probabilístico de error).

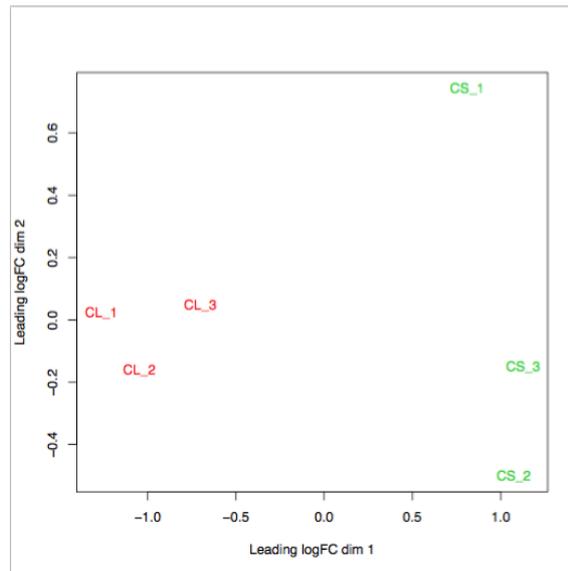
Con el propósito de conocer la similitud en los niveles de expresión de los transcritos entre las muestras de CS y CL (n=6) se realizó un análisis de escalamiento multidimensional (MDS) con ayuda del programa IDEA (Integrated Differential Expression Analysis; <http://zazil.ibt.unam.mx/idea/>). Para realizar este análisis se emplearon los promedios de los niveles de expresión obtenidos con los programas de RSEM y eXpress (Figura 36).

En la Figura 36 se observa que las muestras de CL se encuentran agrupadas con niveles semejantes de expresión, mientras que las muestras de CS se observan desagrupadas con niveles de expresión poco semejantes. Estos resultados sugieren que el tratamiento de luz continua (CL) puede modular de manera sincronizada los niveles de expresión de los transcritos diferencialmente expresados, fenómeno que no se observa entre las muestras del tratamiento de fotoperiodo simulado control (CS).

Una vez identificados los transcritos diferencialmente expresados entre los tratamientos y con la ayuda de las bases de datos generadas para el transcriptoma *De Novo*, se obtuvo la anotación funcional de 112 transcritos para el tratamiento de CS y 24 transcritos para CL.

Tabla 10. Valores de expresión diferencial de los transcritos de alta expresión en el fotoperiodo simulado control (CS) para el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*.

Valores de expresión diferencial de los transcritos de alta expresión en el tratamiento de CS															
No	Contig	RSEM			eXpress			No	Contig	RSEM			eXpress		
		log2FC	FDR	PValue	log2FC	FDR	PValue			log2FC	FDR	PValue	log2FC	FDR	PValue
1	c10726_g1	-2.49	1.3E-03	2.1E-06	-2.45	1.0E-03	1.3E-06	72	c29936_g1	-3.64	1.4E-02	4.3E-05	-3.87	3.9E-02	1.8E-04
2	c10729_g1	-2.67	2.6E-07	4.2E-11	-2.65	3.5E-07	3.3E-11	73	c29936_g2	-1.85	1.3E-04	1.2E-07	-1.82	2.6E-04	1.9E-07
3	c10857_g1	-1.36	3.9E-02	1.8E-04	-1.30	4.8E-02	2.6E-04	74	c29973_g2	-2.73	2.0E-02	6.8E-05	-2.99	2.2E-02	7.4E-05
4	c11121_g1	-2.70	1.2E-03	1.9E-06	-2.62	6.5E-03	1.4E-05	75	c29998_g1	-1.21	4.2E-02	2.0E-04	-1.23	3.4E-02	1.5E-04
5	c12252_g1	-1.51	2.1E-02	7.2E-05	-1.45	4.2E-02	2.2E-04	76	c30047_g1	-3.52	1.4E-02	4.2E-05	-3.51	1.4E-02	4.0E-05
6	c12363_g2	-1.78	3.9E-03	7.6E-06	-1.82	2.4E-03	3.9E-06	77	c30135_g2	-1.54	1.8E-02	5.7E-05	-1.38	3.9E-02	1.9E-04
7	c12398_g1	-2.85	1.4E-05	6.0E-09	-2.85	2.8E-04	2.6E-07	78	c30773_g1	-2.35	3.7E-02	1.7E-04	-2.49	6.7E-03	1.5E-05
8	c1284_g1	-4.51	6.5E-03	1.5E-05	-3.80	3.4E-02	1.5E-04	79	c30787_g1	-10.28	2.7E-02	1.0E-04	-11.45	2.2E-02	7.3E-05
9	c12840_g1	-1.95	3.0E-02	1.2E-04	-1.97	3.3E-02	1.4E-04	80	c30868_g1	-1.38	5.2E-03	1.1E-05	-1.33	1.1E-02	3.2E-05
10	c13369_g1	-3.12	3.6E-05	2.0E-08	-3.14	3.0E-05	9.8E-09	81	c30868_g2	-2.16	2.6E-07	5.2E-11	-2.16	8.0E-07	1.5E-10
11	c13817_g1	-1.39	6.4E-03	1.5E-05	-1.24	2.9E-02	1.1E-04	82	c31141_g1	-3.62	6.4E-03	1.5E-05	-3.18	1.4E-05	4.0E-09
12	c14028_g1	-6.00	5.0E-02	2.5E-04	-6.61	3.9E-02	1.9E-04	83	c31175_g1	-3.13	5.0E-02	2.5E-04	-3.38	9.9E-03	2.5E-05
13	c14625_g1	-4.33	8.7E-04	1.3E-06	-4.52	1.2E-02	3.5E-05	84	c31191_g2	-7.66	3.6E-08	2.7E-12	-3.50	9.5E-07	2.0E-10
14	c14670_g2	-3.92	3.7E-04	4.7E-07	-3.96	7.3E-04	8.0E-07	85	c31354_g1	-1.79	2.0E-02	6.5E-05	-1.76	3.3E-02	1.4E-04
15	c14882_g1	-6.96	1.1E-03	1.7E-06	-5.11	1.8E-03	2.7E-06	86	c3257_g1	-3.35	1.7E-04	1.7E-07	-3.36	5.7E-04	5.7E-07
16	c15163_g1	-2.68	2.6E-02	9.5E-05	-2.81	2.8E-02	1.0E-04	87	c32766_g1	-4.19	2.3E-03	3.9E-06	-4.27	1.0E-03	1.4E-06
17	c16075_g1	-2.22	6.1E-03	1.4E-05	-2.24	9.7E-03	2.4E-05	88	c33081_g1	-1.64	1.2E-02	3.4E-05	-1.63	3.3E-02	1.2E-04
18	c17157_g1	-3.57	1.4E-05	6.0E-09	-3.52	2.6E-04	1.9E-07	89	c33770_g1	-2.94	2.5E-03	4.3E-06	-2.97	1.4E-02	4.2E-05
19	c18116_g2	-3.19	3.2E-02	1.4E-04	-3.14	2.9E-02	1.1E-04	90	c34784_g1	-2.21	1.2E-02	3.3E-05	-2.23	1.1E-02	3.1E-05
20	c18237_g1	-2.80	1.3E-09	6.6E-14	-2.86	1.4E-08	6.6E-13	91	c34922_g1	-6.25	1.4E-02	4.3E-05	-7.03	6.8E-03	1.5E-05
21	c18666_g1	-6.86	8.7E-03	2.2E-05	-7.63	8.2E-03	1.9E-05	92	c37013_g1	-4.19	5.4E-03	1.2E-05	-4.50	2.6E-02	9.4E-05
22	c18789_g1	-2.38	3.9E-04	5.1E-07	-2.40	1.4E-03	1.9E-06	93	c37037_g1	-3.04	1.3E-03	2.0E-06	-3.19	2.4E-03	3.8E-06
23	c18789_g2	-4.92	1.8E-05	8.2E-09	-4.84	1.3E-04	7.6E-08	94	c37351_g1	-1.35	5.9E-03	1.3E-05	-1.29	3.9E-02	1.9E-04
24	c18896_g1	-2.87	1.2E-02	3.4E-05	-2.82	1.2E-02	3.6E-05	95	c38024_g1	-2.60	3.8E-03	7.3E-06	-2.61	4.2E-02	2.1E-04
25	c18998_g1	-2.01	8.8E-03	2.2E-05	-2.05	4.6E-03	9.1E-06	96	c38073_g1	-2.31	4.2E-04	5.6E-07	-2.34	3.0E-03	5.0E-06
26	c19745_g1	-2.15	4.1E-05	2.5E-08	-2.15	8.9E-05	4.6E-08	97	c38264_g1	-2.02	8.5E-04	1.2E-06	-2.05	3.0E-03	5.2E-06
27	c20036_g1	-1.61	2.5E-02	9.0E-05	-1.66	3.3E-02	1.4E-04	98	c39507_g1	-2.91	2.7E-05	1.3E-08	-2.98	1.3E-04	7.1E-08
28	c20037_g1	-4.04	3.2E-05	1.7E-08	-4.14	4.8E-05	1.9E-08	99	c39545_g1	-4.10	3.5E-04	4.3E-07	-4.21	2.5E-02	4.0E-06
29	c20068_g1	-2.80	2.6E-04	3.1E-07	-2.81	3.3E-03	5.7E-06	100	c39735_g1	-3.12	1.4E-03	2.3E-06	-3.25	3.5E-03	6.3E-06
30	c20351_g1	-2.16	2.5E-04	2.8E-07	-2.14	1.3E-03	1.8E-06	101	c3975_g1	-2.50	2.6E-07	4.9E-11	-2.46	7.9E-07	1.3E-10
31	c21007_g1	-2.44	8.1E-05	5.6E-08	-2.35	1.7E-03	2.4E-06	102	c3991_g1	-1.70	1.7E-02	5.2E-05	-1.68	1.6E-02	4.9E-05
32	c21076_g1	-3.93	2.6E-06	7.0E-10	-3.72	1.8E-06	4.2E-10	103	c40258_g1	-3.72	3.2E-02	1.4E-04	-3.74	3.0E-02	1.2E-04
33	c21651_g1	-4.51	7.2E-04	9.9E-07	-4.83	2.7E-03	4.5E-06	104	c43310_g2	-3.26	3.6E-02	1.6E-04	-3.41	4.1E-02	2.0E-04
34	c21780_g1	-2.53	8.2E-06	2.6E-09	-2.54	5.3E-06	1.4E-09	105	c44433_g1	-3.69	4.9E-16	1.2E-20	-3.66	3.8E-16	8.9E-21
35	c22182_g1	-1.86	1.1E-04	9.1E-08	-1.86	1.3E-04	8.0E-08	106	c44791_g1	-2.41	8.1E-05	5.8E-08	-2.36	5.9E-04	6.2E-07
36	c22270_g1	-3.70	1.0E-04	8.3E-08	-3.68	7.7E-04	8.8E-07	107	c45053_g1	-5.64	2.9E-02	1.2E-04	-6.63	4.5E-03	8.6E-06
37	c22979_g2	-3.27	1.2E-02	3.6E-05	-3.58	2.3E-02	7.7E-05	108	c45127_g1	-1.87	2.0E-02	6.9E-05	-1.86	3.7E-02	1.7E-04
38	c23240_g1	-2.23	4.0E-03	7.9E-06	-2.09	2.5E-02	8.6E-05	109	c45292_g1	-4.17	2.9E-04	3.5E-07	-4.26	8.2E-04	9.8E-07
39	c23681_g1	-1.66	3.2E-02	1.3E-04	-1.72	3.4E-02	1.5E-04	110	c45304_g1	-3.52	5.8E-03	1.3E-05	-3.55	1.1E-02	2.8E-05
40	c23803_g2	-2.20	7.8E-04	1.1E-06	-2.11	9.9E-03	2.5E-05	111	c47969_g1	-2.71	3.7E-02	1.7E-04	-2.79	4.9E-02	2.7E-04
41	c24139_g1	-1.28	1.6E-02	4.9E-05	-1.25	3.9E-02	1.8E-04	112	c49084_g1	-6.13	3.6E-02	1.6E-04	-6.71	4.2E-02	2.1E-04
42	c25214_g1	-1.81	8.7E-04	1.3E-06	-1.78	1.6E-03	2.3E-06	113	c50091_g1	-3.28	2.6E-02	9.5E-05	-3.03	3.3E-02	1.4E-04
43	c25214_g2	-3.80	1.3E-07	1.6E-11	-3.97	6.5E-07	9.2E-11	114	c50096_g1	-2.66	1.6E-03	2.7E-06	-2.67	5.4E-03	1.1E-05
44	c25404_g2	-2.21	2.5E-03	4.3E-06	-2.23	5.2E-04	5.2E-07	115	c50998_g1	-1.86	5.2E-03	1.1E-05	-1.87	7.6E-03	1.7E-05
45	c25504_g1	-1.38	1.1E-02	3.0E-05	-1.37	1.4E-02	4.2E-05	116	c51358_g1	-2.08	1.1E-02	2.9E-05	-2.01	3.8E-02	1.7E-04
46	c2560_g1	-2.17	2.8E-02	1.1E-04	-2.29	2.5E-02	8.9E-05	117	c53400_g1	-6.02	4.1E-02	2.0E-04	-6.84	3.4E-02	1.5E-04
47	c26053_g1	-3.37	4.1E-05	2.5E-08	-3.50	8.3E-05	4.1E-08	118	c56781_g1	-3.68	2.2E-02	7.6E-05	-3.68	3.2E-02	1.3E-04
48	c26326_g1	-1.59	2.6E-03	4.8E-06	-1.56	6.7E-03	1.5E-05	119	c56797_g1	-1.51	4.1E-03	8.3E-06	-1.51	9.7E-03	2.4E-05
49	c26362_g2	-1.68	6.9E-03	1.6E-05	-1.71	9.6E-03	2.3E-05	120	c56859_g1	-3.18	8.7E-08	8.6E-12	-3.14	1.1E-07	7.8E-12
50	c26618_g1	-1.28	9.0E-03	2.3E-05	-1.27	9.7E-03	2.4E-05	121	c57018_g1	-2.04	5.2E-03	1.1E-05	-2.07	2.1E-02	6.5E-05
51	c26917_g2	-1.40	2.8E-02	1.1E-04	-1.43	2.1E-02	6.9E-05	122	c57903_g1	-6.73	9.0E-03	2.3E-05	-7.79	4.3E-03	8.1E-06
52	c26922_g1	-1.24	4.3E-02	2.2E-04	-1.27	3.3E-02	1.4E-04	123	c58299_g1	-2.12	1.2E-02	3.3E-05	-2.12	2.5E-02	8.5E-05
53	c27020_g1	-2.14	3.4E-03	8.9E-06	-2.11	4.1E-03	7.4E-06	124	c59626_g1	-4.28	3.7E-02	1.7E-04	-4.77	3.9E-02	1.8E-04
54	c27121_g1	-1.44	2.9E-03	5.3E-06	-1.50	3.0E-03	5.2E-06	125	c6347_g1	-1.83	1.2E-02	3.6E-05	-1.90	2.2E-02	7.5E-05
55	c27779_g1	-1.99	6.5E-04	8.8E-07	-1.95	1.7E-03	2.4E-06	126	c63513_g1	-3.85	9.9E-05	7.6E-08	-3.87	4.5E-04	4.3E-07
56	c27816_g2	-1.43	1.2E-02	3.2E-05	-1.30	4.2E-02	2.1E-04	127	c6376_g1	-2.23	1.5E-05	6.5E-09	-2.20	7.0E-05	3.1E-08
57	c27927_g1	-3.17	2.6E-03	4.8E-06	-3.07	5.8E-03	1.2E-05	128	c63791_g1	-2.54	7.1E-05	4.5E-08	-2.40	1.4E-03	1.9E-06
58	c28346_g1	-1.16	2.8E-02	1.1E-04	-1.18	3.3E-02	1.4E-04	129	c64276_g1	-3.36	1.4E-05	5.0E-09	-3.21	2.6E-04	2.0E-07
59	c28505_g1	-2.87	7.2E-03	1.8E-05	-2.77	2.5E-02	8.8E-05	130	c64610_g1	-2.04	8.2E-06	2.5E-09	-2.04	3.3E-05	1.1E-08
60	c28564_g1	-1.24	3.3E-02	1.4E-04	-1.28	2.9E-02	1.1E-04	131	c64906_g1	-6.04	2.0E-02	6.5E-05	-4.74	3.3E-02	1.4E-04
61	c28614_g1	-2.52	2.3E-03	3.9E-06	-2.24	5.4E-03	1.1E-05	132	c65080_g1	-2.55	5.9E-03	1.3E-05	-2.46	3.9E-02	1.8E-04
62	c28723_g1	-2.40	7.2E-07	1.6E-10	-2.42	6.1E-07	7.1E-11	133	c6534_g1	-3.70	8.2E-05	6.1E-08	-4.09	4.9E-05	2.1E-08
63	c28838_g1	-2.42	2.8E-02	1.0E-04	-2.59	3.4E-02	1.5E-04	134	c65907_g1	-1.83	3.2E-02	1.4E-04	-1.85	4.7E-02	2.5E-04
64	c28881_g1	-3.43	3.8E-04	4.9E-07	-3.55	9.5E-04	1.2E-06	135	c67142_g1	-5.78	1.0E-02	2.6E-05	-6.93	4.1E-04	3.8E-07
65	c29026_g2	-1.68	1.5E-02	4.5E-05	-1.69	9.7E-03	2.4E-05	136	c6795_g1	-1.65	2.4E-04	2.6E-07	-1.57	9.6E-04	1.2E-06
66	c29111_g1	-2.69	1.7E-04	1.7E-07	-2.78	5.9E-04	6.1E-07	137	c6829_g1	-3.23	1.1E-04	8.7E-08	-3.06	1.3E-04	8.5E-08
67	c29111_g2	-1.44	4.3E-03	8.6E-06	-1.48	6.0E-03	1.3E-05	138	c6958_g2	-3.71	1.5E-02	4.7E-05	-3.93	3.0E-02	1.2E-04
68	c29635_g1	-1.29	3.9E-03	7.5E-06	-1.21	1.2E-02	3								



**Figura 36.** Gráfica de Escalamiento multidimensional (MDS) de los transcritos diferencialmente expresados para el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*. CL (Fotoperiodo de luz continua); CS (Fotoperiodo simulado control); logFC (Logaritmo del cambio del nivel de expresión).

Durante este proceso se identificaron 33 transcritos que no presentan anotación funcional de acuerdo a la base transcriptómica de datos (Tabla 11), por lo que se procedió a realizar la anotación funcional manual con la ayuda de los programas de Blastn y Blastx (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

**Tabla 11.** Porcentajes de anotación de transcritos diferencialmente expresados para el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*.

Porcentaje de anotación de transcritos diferencialmente expresados		
Concepto	Cantidad	Porcentaje
Total de transcritos	169	100%
Transcritos de alta expresión en CS	141	83.43%
Transcritos de alta expresión en CL	28	16.57%
Transcritos anotados en base de datos	136	80.47%
Transcritos ambiguos en base de datos	22	13.02%
Transcritos no anotados de alta expresión en CS	3	1.78%
Transcritos no anotados de alta expresión en CL	8	4.73%

Con el análisis de anotación manual se identificaron transcritos que presentan anotaciones ambiguas, es decir que su identidad no se encuentra plenamente identificada en las bases de datos internacionales. Para los tratamientos de CL y CS se identificaron 21 transcritos y 1 transcritos ambiguos respectivamente. Además, se identificaron 8 transcritos no anotados que presentan alta expresión en el tratamiento de fotoperiodo simulado control y 3 transcritos no anotados que presentan alta expresión en el tratamiento de luz continua (Tabla 11).



Con los datos obtenidos se realizaron tablas diferenciadas en 3 grupos: Transcritos anotados, transcritos ambiguos y transcritos no anotados. En la Tabla 12 se observan los 112 transcritos anotados para el tratamiento de fotoperiodo simulado control (CS) y en la Tabla 13 se muestran los 24 transcritos anotados para el tratamiento de luz continua (CL). Como puede advertirse en las Tablas 12 y 13, existen múltiples transcritos que presentan la misma anotación. Tal es el caso de los genes *adyc8*, *camk1d-like*, *cngb1*, *gucy2f*, *scn2a*, *plch2*, *opn1sw*, *col2a1* y *lamb3*, cada uno esta anotado en dos contigs diferentes. Mientras que los genes *piccolo*, *myo7a*, *kcnma1* y *slc43a2* que se encuentran anotados para tres contigs cada uno. Por último el gen *abca4*, cuenta con anotaciones en cinco contigs diferentes.

**Tabla 12.** Transcritos de alta expresión anotados en el fotoperiodo de luz continua (CS) para el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*.

No	ID	Nombre	Contig	pb	log2FC
1	<i>abca4</i>	ATP-binding cassette, subfamily A (ABC1), member 4	c29936_g1_i1	442	-3.76
2	<i>abca4</i>	ATP-binding cassette, subfamily A (ABC1), member 4	c29936_g2_i1	6246	-1.84
3	<i>abca4</i>	ATP-binding cassette, subfamily A (ABC1), member 4	c29973_g2_i1	716	-2.86
4	<i>abca4</i>	ATP-binding cassette, subfamily A (ABC1), member 4	c39545_g1_i1	705	-4.15
5	<i>abca4</i>	ATP-binding cassette, subfamily A (ABC1), member 4	c44791_g1_i1	1790	-2.38
6	<i>abhd8</i>	Abhydrolase domain-containing protein 8	c11121_g1_i1	1126	-2.66
7	<i>adcy8</i>	Adenylate cyclase 8	c13369_g1_i1	1905	-3.13
8	<i>adcy8</i>	Adenylate cyclase 8	c64610_g1_i1	980	-2.04
9	<i>ahctf1</i>	Protein ELYS	c6534_g1_i1	691	-3.90
10	<i>amph</i>	Amphiphysin	c26362_g2_i1	712	-1.69
11	<i>ank</i>	Ankyrin	c29026_g2_i1	2348	-1.68
12	<i>ankrd33</i>	Ankyrin repeat domain-containing protein 33	c20036_g1_i1	1142	-1.63
13	<i>ano1</i>	Anoctamin-1	c25214_g1_i1	2749	-1.80
14	<i>ano2</i>	Anoctamin-2	c25214_g2_i2	1256	-3.89
15	<i>apoa4-like</i>	Apolipoprotein A IV-Like	c29799_g2_i1	239	-3.42
16	<i>arl13b</i>	ADP-ribosylation factor-like protein 13B	c64276_g1_i1	1441	-3.29
17	<i>arf6</i>	ATP-dependent 6-phosphofructokinase isozyme 1	c30135_g2_i1	751	-1.46
18	<i>atcay</i>	Caytaxin	c29794_g1_i1	1508	-1.23
19	<i>cacna2d1</i>	Voltage-dependent calcium channel alpha-2/delta-1	c22270_g1_i1	1035	-3.69
20	<i>camk1d-like</i>	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1D-like	c10857_g1_i1	1020	-1.33
21	<i>camk1d-like</i>	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1D-like	c37037_g1_i1	704	-3.11
22	<i>cd38</i>	ADP-ribosyl cyclase 1	c64906_g1_i1	1411	-5.39
23	<i>cdhr1</i>	Cadherin related family member 1	c45053_g1_i1	329	-6.14
24	<i>cdhr5</i>	Cadherin-related family member 5-like	c34922_g1_i1	266	-6.64
25	<i>cdr2</i>	Cerebellar degeneration related protein 2	c65907_g1_i1	541	-1.84
26	<i>cep290</i>	Centrosomal protein 290	c38024_g1_i1	813	-2.60
27	<i>cngb1</i>	Cyclic nucleotide gated channel beta 1	c29635_g1_i1	2224	-1.25
28	<i>cngb1</i>	Cyclic nucleotide-gated cation channel beta-1-like	c16075_g1_i1	1086	-2.23
29	<i>cobl1</i>	Cordon-Bleu WH2 Repeat Protein-Like 1	c21007_g1_i1	1112	-2.40
30	<i>cplx3</i>	Complexin-3	c50998_g1_i1	1550	-1.86
31	<i>crtac1</i>	Cartilage acidic protein 1	c21651_g1_i1	944	-4.67
32	<i>cs</i>	Ctrate synthase, mitochondrial	c30787_g1_i1	744	-10.86
33	<i>esrrg</i>	Estrogen Related Receptor Gamma	c43310_g2_i1	531	-3.33
34	<i>faim2</i>	Fas Apoptotic Inhibitory Molecule 2	c29838_g1_i1	1663	-1.99
35	<i>fam161a</i>	Family With Sequence Similarity 161 Member A	c45292_g1_i1	799	-4.22
36	<i>fmn1</i>	Formin 1	c24139_g1_i1	1022	-1.27
37	<i>gimap5</i>	GTPase, IMAP Family Member 5	c18666_g1_i1	461	-7.24
38	<i>gpr98</i>	G-protein coupled receptor 98	c23803_g2_i1	1684	-2.15
39	<i>grin2a</i>	Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2A	c63791_g1_i1	1629	-2.47
40	<i>guca1a</i>	Guanylate cyclase activator 1	c58299_g1_i1	774	-2.12
41	<i>gucy2f</i>	Guanylate cyclase 2F	c17157_g1_i1	1166	-3.55
42	<i>gucy2f</i>	Guanylate cyclase 2F	c6795_g1_i1	4348	-1.61
43	<i>kcnma1</i>	Potassium large conductance calcium-activated channel subfamily M alpha member 1	c18998_g1_i1	2956	-2.03
44	<i>kcnma1</i>	Potassium large conductance calcium-activated channel subfamily M alpha member 1	c28723_g1_i1	2914	-2.41
45	<i>kcnma1</i>	Potassium large conductance calcium-activated channel subfamily M alpha member 1	c45127_g1_i1	508	-1.87
46	<i>kif25-like</i>	Kinesin family member 25-like	c28838_g1_i1	784	-2.51
47	<i>l1td1</i>	LINE-1 type transposase domain-containing protein 1	c56859_g1_i1	1239	-3.16
48	<i>lactbl1</i>	Lactamase Beta Like 1	c50096_g1_i1	1153	-2.67
49	<i>lbh-like</i>	Limb Bud And Heart Development	c6347_g1_i1	1078	-1.86



No	ID	Nombre	Contig	pb	log2FC
50	<i>lrit1</i>	Immunoglobulin-like domain and transmembrane domain-containing protein 1	c12252_g1_i1	1655	-1.48
51	<i>lrit3</i>	Leucine-rich repeat, immunoglobulin-like and transmembrane domains 3	c14625_g1_i1	619	-4.42
52	<i>lyz</i>	Lysozyme C	c44433_g1_i1	761	-3.67
53	<i>march1</i>	E3 ubiquitin-protein ligase MARCH1/8	c19745_g1_i1	1425	-2.15
54	<i>muc2</i>	Intestinal mucin-2	c31354_g1_i1	1520	-1.78
55	<i>myh3</i>	Myosin Heavy Chain 3	c37351_g1_i1	2128	-1.32
56	<i>myo7a</i>	Myosin VIIa	c10726_g1_i1	4177	-2.47
57	<i>myo7a</i>	Myosin VIIa	c49084_g1_i1	348	-6.42
58	<i>myo7a</i>	Myosin VIIa	c53400_g1_i1	345	-6.43
59	<i>ndufaf3</i>	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex assembly factor 3	c28564_g1_i3	2658	-1.26
60	<i>opn1sw</i>	Short wavelength-sensitive opsin	c12363_g2_i1	1047	-1.80
61	<i>opn1sw</i>	Short wavelength-sensitive opsin	c27779_g1_i1	1079	-1.97
62	<i>osbp17</i>	Oxysterol-binding protein-related protein 7	c20037_g1_i1	861	-4.09
63	<i>pcbp3</i>	Poly(rC)-binding protein 2/3/4	c21076_g1_i2	553	-3.82
64	<i>pcbp4</i>	Poly(rC)-binding protein 2/3/4	c26917_g2_i1	867	-1.42
65	<i>pclp</i>	Protein piccolo	c18789_g1_i1	1498	-2.39
66	<i>pclp</i>	Protein piccolo	c18789_g2_i1	1049	-4.88
67	<i>pclp</i>	Protein piccolo	c3975_g1_i1	2885	-2.48
68	<i>pde5</i>	cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase	c38264_g1_i1	1340	-2.04
69	<i>pde6a</i>	Rod cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase subunit alpha	c30868_g1_i1	5053	-1.36
70	<i>pde6b</i>	Rod cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase subunit beta	c30868_g2_i1	4819	-2.16
71	<i>pde6c</i>	Cone cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase subunit alpha	c26053_g1_i1	673	-3.44
72	<i>pip5k1a</i>	Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase 1a	c34784_g1_i1	1131	-2.22
73	<i>plch2</i>	Phosphatidylinositol phospholipase C-2	c12398_g1_i1	1473	-2.85
74	<i>plch2</i>	Phosphatidylinositol phospholipase C2	c26326_g1_i1	2424	-1.58
75	<i>plekhd1</i>	Pleckstrin homology domain containing, family D (with coiled-coil domains) member 1	c18237_g1_i1	1210	-2.83
76	<i>ppp1r9a</i>	Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit 9A	c29998_g1_i1	1569	-1.22
77	<i>prom1</i>	Prominin 1	c21780_g1_i1	2774	-2.53
78	<i>prph2</i>	Peripherin-2	c20068_g1_i1	1016	-2.80
79	<i>rd3</i>	Retinal Degeneration 3	c57018_g1_i1	895	-2.05
80	<i>rdh13</i>	Retinol dehydrogenase 13	c8201_g1_i1	568	-1.65
81	<i>rgs9</i>	Regulator of G-protein signaling 9	c25504_g1_i1	1278	-1.38
82	<i>rorb</i>	RAR-related orphan receptor beta	c56797_g1_i1	1966	-1.51
83	<i>samd7</i>	Sterile Alpha Motif Domain Containing 7	c65080_g1_i1	617	-2.50
84	<i>sc5dl</i>	Lathosterol oxidase	c28881_g1_i1	982	-3.49
85	<i>scn2a</i>	sodium channel protein type 2 subunit alpha-like	c40258_g1_i1	382	-3.73
86	<i>scn2a</i>	Voltage-gated sodium channel type 2 alpha	c23240_g1_i1	1597	-2.16
87	<i>scn4a-like</i>	Sodium channel protein type 4 subunit alpha-like	c32766_g1_i1	294	-4.23
88	<i>serinc1</i>	Serine incorporator 1-like	c15163_g1_i1	611	-2.74
89	<i>serinc4</i>	Serine incorporator 4	c6829_g1_i1	1596	-3.14
90	<i>sgk1</i>	Serum/glucocorticoid-regulated kinase 1	c27816_g2_i1	556	-1.37
91	<i>slc17a7</i>	MFS transporter, ACS solute carrier family 17, (vesicular glutamate transporter) member 7	c51358_g1_i1	1211	-2.05
92	<i>slc17a7</i>	Excitatory amino acid transporter 5 / Solute Carrier Family 1 Member 7	c33770_g1_i1	956	-2.96
93	<i>slc22a13</i>	MFS transporter, OCT family, solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 13	c30047_g1_i1	1189	-3.52
94	<i>slc24a1</i>	Sodium/potassium/calcium exchanger 1	c26922_g1_i1	2835	-1.25
95	<i>slc24a2</i>	Solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 2	c45304_g1_i1	694	-3.53
96	<i>slc34a1</i>	Solute carrier family 34a1 (sodium-dependent phosphate cotransporter)	c63513_g1_i1	1399	-3.86
97	<i>slc6a1</i>	Sodium- and chloride-dependent GABA transporter 1	c1284_g1_i1	356	-4.15
98	<i>srm3</i>	Serine/arginine repetitive matrix 3	c23681_g1_i1	472	-1.69
99	<i>stra6</i>	Stimulated By Retinoic Acid 6	c47969_g1_i1	608	-2.75
100	<i>stx3</i>	Syntaxin 3	c10729_g1_i1	3264	-2.66
101	<i>sv2a</i>	MFS transporter, VNT family, synaptic vesicle glycoprotein 2a	c33081_g1_i1	1360	-1.63
102	<i>sws2a/b</i>	Short-wavelength sensitive opsin 2A beta and short-wavelength sensitive opsin 2B genes	c27020_g1_i1	410	-2.13
103	<i>syt1</i>	Synaptotagmin-1	c20351_g1_i1	905	-2.15
104	<i>syt2</i>	Synaptotagmin-2	c28346_g1_i1	2029	-1.17
105	<i>syvn1</i>	E3 Ubiquitin-Protein Ligase Synoviolin	c30773_g1_i1	289	-2.42
106	<i>tigd1-like</i>	Tigger transposable element-derived protein 1-like	c31175_g1_i1	653	-3.25
107	<i>tmem132d</i>	Transmembrane protein 132D	c37013_g1_i1	461	-4.34
108	<i>tmem138</i>	Transmembrane protein 138	c39507_g1_i1	779	-2.95
109	<i>tulp1</i>	Tubby-related protein 1	c6376_g1_i1	1334	-2.22
110	<i>unc13b</i>	Protein unc-13b	c29723_g3_i1	5339	-2.52
111	<i>usp21</i>	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 2/21	c26618_g1_i2	1944	-1.28
112	<i>wasf1</i>	WAS protein family, member 1	c3991_g1_i2	840	-1.69

ID (Identificador del gen de acuerdo a bases de datos internacionales); Contig (Identificador de gen e isoforma del transcrito); pb (Longitud del transcrito en pares de bases); log2FC (Cambio del nivel de expresión en logaritmo en base 2 promediado de RSEM y eXpress), valores negativos indican baja expresión en el tratamiento de CL.

**Tabla 13.** Transcritos de alta expresión anotados en el fotoperiodo de luz continua (CL) para el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*.

Transcritos de alta expresión anotados en el tratamiento de CL					
No	ID	Nombre	Contig	pb	log2FC
1	<i>ankrd9</i>	Ankyrin repeat domain 9	c58709_g1_i1	561	1.35
2	<i>aqp3</i>	Aquaporin-3	c36859_g1_i1	1338	1.74
3	<i>col2a1</i>	Collagen alpha-1(II) chain-like	c18738_g1_i1	247	3.02
4	<i>col2a1</i>	Collagen alpha-1(II) chain-like	c31946_g1_i1	1070	2.89
5	<i>ctgf</i>	Connective tissue growth factor	c28725_g1_i1	1927	1.19
6	<i>cyp2k</i>	Cytochrome P450 2K1-like	c26096_g2_i1	495	1.85
7	<i>egfr</i>	Epidermal growth factor receptor	c13523_g1_i1	5148	1.25
8	<i>fcgbp</i>	Fc fragment of IgG binding protein	c36737_g1_i1	2517	1.50
9	<i>gimap4</i>	Gtpase IMAP Family member 4, union a GTP	c57314_g1_i1	3316	1.27
10	<i>hgs</i>	Hepatocyte growth factor -regulated tyrosine kinase substrate-like	c53925_g1_i1	447	3.09
11	<i>hist1h1b</i>	Histone cluster 1, H1b	c18798_g1_i1	1266	1.28
12	<i>lactb2</i>	Beta lactamase like protein2	c30410_g1_i1	1565	1.64
13	<i>klf5</i>	Krüppel-like factor 5	c23901_g1_i1	1303	1.33
14	<i>lamb3</i>	Laminin, beta 3	c17493_g1_i1	1079	2.18
15	<i>lamb3</i>	Laminin, beta 3	c4014_g1_i1	1262	2.05
16	<i>natt3</i>	Natterin-3 like	c31663_g1_i1	1356	1.40
17	<i>pdk2</i>	Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) Kinase isozyme 2 mitochondrial	c53222_g1_i1	473	1.13
18	<i>prss57</i>	Serine-Protease 57-like	c30547_g1_i1	1013	1.37
19	<i>slc43a2</i>	Solute Carrier Family 43 (Amino Acid System L Transporter), Member 2	c14070_g1_i1	1498	1.79
20	<i>slc43a2</i>	Solute Carrier Family 43 (Amino Acid System L Transporter), Member 2	c24038_g1_i1	523	1.84
21	<i>slc43a2</i>	Solute Carrier Family 43 (Amino Acid System L Transporter), Member 2	c6356_g1_i1	1533	1.57
22	<i>sparcl1</i>	SPARC-like protein 1	c20007_g1_i1	234	2.66
23	<i>tef</i>	Thyrotrop embryonic factor	c30755_g1_i1	3409	1.32
24	<i>ucp2</i>	Mitochondrial uncoupling protein 2-like	c28446_g1_i1	671	1.60

ID (Identificador del gen de acuerdo a bases de datos internacionales); Contig (Identificador de gen e isoforma del transcritto); pb (Longitud del transcritto en pares de bases); log2FC (Cambio del nivel de expresión en logaritmo en base 2 promediado de RSEM y eXpress), valores positivos indican alta expresión en el tratamiento de CL.

Estas observaciones sugieren que las repeticiones de los genes se debe posiblemente a que múltiples isoformas del mismo gen están presentes y se encuentran diferencialmente expresadas o bien que cada contig sea un fragmento parcial o paralogos para un mismo gen, por lo que en total se identificaron 95 genes para CS y 20 genes para CL.

Por otro lado, los transcritos que presentan anotaciones ambiguas se colocaron en una tabla, que describe las múltiples anotaciones presentes para cada contig (Tabla 14). En la tabla se observa que los contigs presentan valores similares de anotación para varios genes de acuerdo a los programas de blastn y blastx. Esta multiplicidad en la anotación sugiere que en las bases de datos internacionales, no existe una anotación precisa de estos transcritos expresados diferencialmente. En un futuro se deben de caracterizar a mayor profundidad estas secuencias con el fin de identificar su anotación precisa o en su defecto reportar el descubrimiento de un “nuevo” gen y sus posibles funciones regulatorias en relación al efecto del fotoperiodo en el pez blanco de Pátzcuaro.

Es importante mencionar que la mayoría de los transcritos que presentan una anotación ambigua se identifican con secuencias de peces teleósteos, esto sugiere que efectivamente las secuencias pertenecen a miembros de esta infra clase taxonómica. Sin embargo, en el contig de alta expresión en luz continua c22274\_g1\_i1 se observa que existe una sola coincidencia con el pez *Fundulus*



*heteroclitus*, las demás coincidencias son con otros animales como aves y mamíferos, esto sugiere que el transcripto no ha sido identificado en otros teleosteos. En conjunto los contigs c12840\_g1\_i1 y c3257\_g1\_i1, presentan anotaciones de proteínas sin caracterización o hipotéticas (Tabla 14); debido a estas particularidades, los tres transcriptos podrían ser candidatos idóneos para caracterizarlos en futuras investigaciones.

**Tabla 14.** Transcriptos diferencialmente expresados con anotación ambigua en el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*.

Transcritos con anotación ambigua diferencialmente expresados								
No	Trat	Contig	pb	log2FC	Probables ID	E- Value	Prog	
1	CL	c22274_g1_i1	247	2.58	cep295	PREDICTED: Fundulus heteroclitus centrosomal protein 295 (cep295), transcript variant X5, mRNA	6.00E-05	BLASTN
					slc22a6b-like	PREDICTED: Pseudopodoces humilis solute carrier family 22 member 6-B-like (LOC102105336), mRNA	4.00E-07	
					peg10	PREDICTED: Mus pahari paternally expressed 10 (Peg10), mRNA	6.00E-05	
2	CS	c12840_g1_i1	781	-1.96	uncharacterized	PREDICTED: Acanthochromis polyacanthus uncharacterized LOC110953511 (LOC110953511), ncRNA	7.00E-86	BLASTN
					uncharacterized	PREDICTED: Oreochromis niloticus uncharacterized LOC102076330 (LOC102076330), miscRNA	4.00E-70	
					uncharacterized	PREDICTED: Larimichthys crocea uncharacterized LOC104924837 (LOC104924837), ncRNA	2.00E-48	
3	CS	c13817_g1_i1	523	-1.31	pde4dip	LOW QUALITY PROTEIN: myomegalin-like [Oncorhynchus kisutch]	7.00E-07	BLASTX
					tle-4	PREDICTED: Cyprinodon variegatus transducin-like enhancer protein 4 (LOC107085289) mRNA	6.00E-15	
					rapgef5-like	PREDICTED: Paralichthys olivaceus rap guanine nucleotide exchange factor 5-like (LOC109633202), mRNA	2.00E-14	
4	CS	c14670_g2_i1	758	-3.94	pin1	PREDICTED: Larimichthys crocea peptidylprolyl cis/trans isomerase, NIMA-interacting 1 (pin1), mRNA	5.00E-10	BLASTN
					nabp2-like	PREDICTED: Callorhynchus milii SOSS complex subunit B1-like (LOC103191330), mRNA	5.00E-10	
					gvinp1-like	PREDICTED: Stegastes partitus interferon-induced very large GTPase 1-like (LOC103359684), mRNA	2.00E-111	
5	CS	c14882_g1_i1	360	-6.03	urgcp-like	PREDICTED: Stegastes partitus up-regulator of cell proliferation-like (LOC103359685), mRNA	7.00E-99	BLASTN
					gvinp1-like	PREDICTED: interferon-induced very large GTPase 1-like [Stegastes partitus]	2.00E-89	
					urgcp-like	PREDICTED: up-regulator of cell proliferation-like [Stegastes partitus]	2.00E-82	
6	CS	c18116_g2_i1	1325	-3.16	dda1	PREDICTED: Austrofundulus limnaeus DET1 and DDB1 associated 1 (dda1), mRNA	2.00E-18	BLASTN
					pnba-like	PREDICTED: Kryptolebias marmoratus para-nitrobenzyl esterase-like (LOC108251539), mRNA	3.00E-16	
					inha	PREDICTED: Poecilia reticulata inhibin alpha subunit (inha), mRNA	4.00E-15	
7	CS	c27121_g1_i1	421	-1.47	cst7	PREDICTED: Poecilia reticulata cystatin-F (LOC103477419), transcript variant X4, mRNA	2.00E-13	BLASTX
					fth1	ferritin [Pasteurella multocida]	9.10E-02	
					ty3/gypsy-like	Tetraodon nigroviridis partial TY3/GYPSY-like LTR retrotransposon Sushi4_Tet	1.00E-117	
8	CS	c27927_g1_i1	363	-3.12	retf2-1-like	Retrotransposable element Tf2 protein type 1 [Larimichthys crocea]	0.00E+00	BLASTX
					irfn4b	uncharacterized protein irfn4b isoform X2 [Danio rerio]	0.00E+00	
					pol	Pol polyprotein [Dicentrarchus labrax]	8.00E-178	
9	CS	c29111_g1_i1	1228	-2.74	rt1-like	PREDICTED: retrotransposon-like protein 1 [Poecilia latipinna]	4.00E-171	BLASTN
					myo9-like	PREDICTED: Kryptolebias marmoratus myosin-9-like (LOC108242927), transcript variant X3, mRNA	3.00E-138	
					numa1-like	PREDICTED: Austrofundulus limnaeus nuclear mitotic apparatus protein 1-like (LOC106516472), mRNA	8.00E-120	
10	CS	c29111_g2_i1	1108	-1.46	mrip	PREDICTED: Cyprinodon variegatus myosin phosphatase Rho-interacting protein-like (LOC107095142), mRNA	6.00E-115	BLASTN
					tchh-like	PREDICTED: Stegastes partitus trichohyalin-like (LOC103375454), mRNA	2.00E-114	
					myh14	PREDICTED: Xiphophorus maculatus myosin, heavy chain 14, non-muscle (myh14), mRNA	1.00E-112	
11	CS	c31141_g1_i1	1421	-3.40	cfap58	PREDICTED: Monopterus albus cilia- and flagella-associated protein 58-like (LOC109958876), mRNA	1.00E-111	BLASTX
					lrrc	PREDICTED: Oreochromis niloticus putative leucine-rich repeat-containing protein DDB_G0290503	1.00E-111	
					numa1-like	PREDICTED: nuclear mitotic apparatus protein 1-like [Austrofundulus limnaeus]	5.00E-68	
12	CS	c29111_g2_i1	1108	-1.46	tchh-like	PREDICTED: trichohyalin-like [Stegastes partitus]	5.00E-68	BLASTN
					myo9-like	PREDICTED: myosin-9-like isoform X3 [Kryptolebias marmoratus]	9.00E-67	
					golga4	PREDICTED: golgin subfamily A member 4-like isoform X1 [Nothobranchius furzeri]	2.00E-64	
13	CS	c29111_g2_i1	1108	-1.46	myh14	PREDICTED: myosin-14 [Xiphophorus maculatus]	3.00E-64	BLASTX
					mrip	myosin phosphatase Rho-interacting protein-like [Acanthochromis polyacanthus]	7.00E-64	
					col4a1-like	PREDICTED: Stegastes partitus collagen alpha-1(IV) chain-like (LOC103366576), mRNA	1.00E-22	
14	CS	c29111_g2_i1	1108	-1.46	enod2-like	PREDICTED: Poecilia latipinna early nodulin-75-like (LOC106937373), mRNA	2.00E-20	BLASTN
					muc2-like	PREDICTED: Notothenia coriiceps mucin-2-like (LOC104960553), partial mRNA	2.00E-20	
					rbp1-like	PREDICTED: Salmo salar DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1-like (LOC106565602), mRNA	7.00E-19	
15	CS	c29111_g2_i1	1108	-1.46	ssp2-like	PREDICTED: Salmo salar sporozoite surface protein 2-like (LOC106595448), mRNA	1.00E-16	BLASTX
					srpk3-like	PREDICTED: Labrus bergylta SRSF protein kinase 3-like (LOC110002527), transcript variant X3, mRNA	1.00E-14	
					ancey	hypothetical protein ANCEY_02997 [Ancylostoma ceylanicum]	1.20E-01	
16	CS	c29111_g2_i1	1108	-1.46	mage2-like	PREDICTED: MAGE-like protein 2 isoform X5 [Homo sapiens]	4.80E-01	BLASTX
					co1a1-like	PREDICTED: collagen alpha-1(X) chain-like [Aplysia californica]	1.40E+00	
					c2orf71	PREDICTED: Larimichthys crocea uncharacterized protein C2orf71 homolog (LOC109138119), mRNA	3.00E-143	
17	CS	c29111_g2_i1	1108	-1.46	usp36-like	PREDICTED: Lates calcarifer ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 36-like (LOC108899301), mRNA	9.00E-94	BLASTN
					c2orf71	PREDICTED: uncharacterized protein C2orf71 homolog [Larimichthys crocea]	3.00E-39	
					gprc6a	G-protein coupled receptor family C group 6 member A [Larimichthys crocea]	4.00E-39	
18	CS	c29111_g2_i1	1108	-1.46	usp36-like	PREDICTED: ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 36-like [Lates calcarifer]	1.00E-38	BLASTX
					c2orf71	PREDICTED: Larimichthys crocea uncharacterized protein C2orf71 homolog (LOC109138119), mRNA	3.00E-87	
					c2orf71	PREDICTED: uncharacterized protein C2orf71-like [Stegastes partitus]	2.00E-85	
19	CS	c31141_g1_i1	1421	-3.40	gprc6a	G-protein coupled receptor family C group 6 member A [Larimichthys crocea]	1.00E-67	BLASTX
					slaf7	PREDICTED: Oreochromis niloticus SLAM family member 7 (LOC100692222), transcript variant X5, mRNA	2.00E-26	
					cd48	PREDICTED: Labrus bergylta CD48 antigen-like (LOC110001294), partial mRNA	3.00E-11	
20	CS	c31141_g1_i1	1421	-3.40	slaf7	PREDICTED: SLAM family member 7 isoform X1 [Oreochromis niloticus]	3.00E-25	BLASTN
					slaf9	PREDICTED: SLAM family member 9-like isoform X2 [Poecilia mexicana]	1.00E-22	
					cd48	PREDICTED: CD48 antigen-like isoform X1 [Larimichthys crocea]	1.00E-21	



Transcritos con anotación ambigua diferencialmente expresados							(Continuación)	
No	Trat	Contig	pb	log2FC	Probables ID	Especie/Nombre	E-Value	Prog
12	CS	c31191_g2_i1	419	-5.58	<i>cables2</i>	PREDICTED: <i>Oncorhynchus mykiss</i> CDK5 and ABL1 enzyme substrate 2-like (LOC110531283), mRNA	4.00E-04	BLASTN
					<i>mstd84dd-like</i>	PREDICTED: <i>Drosophila kikkawai</i> male-specific sperm protein Mst84Dd-like (LOC108085400), mRNA	4.00E-04	
					<i>peg10</i>	PREDICTED: <i>Mus pahari</i> paternally expressed 10 (Peg10), mRNA	1.00E-03	
					<i>erich-3</i>	PREDICTED: <i>Orbicella faveolata</i> glutamate-rich protein 3-like (LOC110064060), mRNA	1.00E-03	
					<i>cwc25</i>	PREDICTED: <i>Sturnus vulgaris</i> CWC25 spliceosome-associated protein homolog (CWC25), mRNA	1.00E-03	
13	CS	c3257_g1_i1	672	-3.35	<i>fgfr4</i>	PREDICTED: <i>Tupaia chinensis</i> fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4), mRNA	1.00E-03	BLASTN
					<i>cmtr1</i>	PREDICTED: <i>Hippocampus comes</i> cap methyltransferase 1 (cmtr1), transcript variant X3, misc_RNA	1.00E-19	
					<i>unnamed</i>	unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	2.00E-32	
					<i>hypothetical</i>	hypothetical protein EH28_05877 [Larimichthys crocea]	4.00E-30	
					<i>hypothetical</i>	hypothetical protein cypCar_00620028 [Cyprinus carpio]	2.00E-25	
14	CS	c38073_g1_i1	1564	-2.32	<i>enoph1-like</i>	PREDICTED: <i>Neolamprologus brichardi</i> enolase-phosphatase E1-like (LOC102798262), mRNA	1.00E-35	BLASTN
					<i>srp-like</i>	PREDICTED: <i>Haplochromis burtoni</i> serine-rich adhesin for platelets-like (LOC102291168), mRNA	2.00E-33	
					<i>rp1-like</i>	PREDICTED: <i>Nothobranchius furzeri</i> retinitis pigmentosa 1-like 1 (rp11), mRNA	2.00E-32	
					<i>dspp</i>	PREDICTED: <i>Oreochromis niloticus</i> dentin sialophosphoprotein (LOC102078384), mRNA	8.00E-32	
					<i>muc4-like</i>	PREDICTED: <i>Austrofundulus limnaeus</i> mucin-4-like (LOC106525300), transcript variant X2, mRNA	4.00E-30	
					<i>futsch-like</i>	PREDICTED: <i>Kryptolebias marmoratus</i> microtubule-associated protein futsch-like (LOC108242481), mRNA	6.00E-27	
					<i>futsch-like</i>	PREDICTED: microtubule-associated protein futsch-like [Kryptolebias marmoratus]	5.00E-20	
					<i>stm-like</i>	PREDICTED: protein starmaker-like [Poecilia reticulata]	2.00E-09	
					<i>muc4-like</i>	PREDICTED: mucin-4-like [Austrofundulus limnaeus]	2.00E-08	
					<i>rp1-like</i>	PREDICTED: retinitis pigmentosa 1-like 1 protein [Poecilia formosa]	4.00E-08	
15	CS	c39735_g1_i1	1091	-3.19	<i>enoph1-like</i>	PREDICTED: enolase-phosphatase E1-like [Neolamprologus brichardi]	9.00E-05	BLASTX
					<i>dspp</i>	PREDICTED: dentin sialophosphoprotein [Oreochromis niloticus]	1.00E-04	
					<i>gvinp1-like</i>	PREDICTED: <i>Larimichthys crocea</i> interferon-induced very large GTPase 1-like (LOC104938488), mRNA	0.00E+00	
					<i>urgcp-like</i>	PREDICTED: <i>Lates calcarifer</i> up-regulator of cell proliferation-like (LOC108894403), mRNA	0.00E+00	
					<i>urgcp-like</i>	PREDICTED: up-regulator of cell proliferation-like [Lates calcarifer]	1.00E-155	
16	CS	c50091_g1_i1	379	-3.15	<i>gvinp1-like</i>	PREDICTED: interferon-induced very large GTPase 1-like [Larimichthys crocea]	2.00E-154	BLASTX
					<i>znf407</i>	PREDICTED: <i>Notothenia coriiceps</i> zinc finger protein 407-like (LOC104948785), partial mRNA	5.80E-01	
					<i>capn10</i>	PREDICTED: <i>Ornithorhynchus anatinus</i> calpain-10-like (LOC100073389), mRNA	5.80E-01	
					<i>pep5</i>	PREDICTED: <i>Poecilia reticulata</i> peroxisomal biogenesis factor 5 (pep5), transcript variant X3, mRNA	2.00E+00	
					<i>zan-like</i>	PREDICTED: <i>Lates calcarifer</i> zonadhesin-like (LOC108879716), transcript variant X3, mRNA	0.00E+00	
17	CS	c56781_g1_i1	894	-3.68	<i>fcgfbp-like</i>	PREDICTED: <i>Oryzias latipes</i> IgGfC-binding protein-like (LOC101162078), mRNA	0.00E+00	BLASTN
					<i>zan-like</i>	PREDICTED: zonadhesin-like [Nothobranchius furzeri]	3.00E-168	
					<i>fcgfbp-like</i>	PREDICTED: IgGfC-binding protein-like [Maylandia zebra]	1.00E-156	
					<i>golga6l2</i>	PREDICTED: <i>Maylandia zebra</i> golgin subfamily A member 6-like protein 22 (LOC105940623), mRNA	1.00E-37	
					<i>glimap4-like</i>	PREDICTED: <i>Pundamilia nyererei</i> GTPase IMAP family member 4-like (LOC102213286), mRNA	1.00E-37	
					<i>wdr87-like</i>	PREDICTED: <i>Haplochromis burtoni</i> WD repeat-containing protein 87-like (LOC102294966), mRNA	1.00E-36	
					<i>glimap8-like</i>	PREDICTED: <i>Kryptolebias marmoratus</i> GTPase IMAP family member 8-like (LOC108245848), mRNA	4.00E-31	
					<i>pap85-like</i>	PREDICTED: <i>Acanthochromis polyacanthus</i> vicilin-like seed storage protein At2g18540, partial mRNA	6.00E-28	
					<i>golga6l2</i>	PREDICTED: golgin subfamily A member 6-like protein 22 [Maylandia zebra]	1.00E-14	
					<i>glimap8-like</i>	PREDICTED: GTPase IMAP family member 8-like [Austrofundulus limnaeus]	7.00E-13	
18	CS	c57903_g1_i1	562	-7.26	<i>ian12-like</i>	PREDICTED: immune-associated nucleotide-binding protein 12-like [Oreochromis niloticus]	1.00E-12	BLASTX
					<i>glimap4-like</i>	PREDICTED: GTPase IMAP family member 4-like [Poecilia formosa]	5.00E-12	
					<i>wdr87-like</i>	PREDICTED: WD repeat-containing protein 87-like [Haplochromis burtoni]	5.00E-11	
					<i>zan-like</i>	PREDICTED: <i>Poecilia mexicana</i> zonadhesin (zan), mRNA	2.00E-87	
					<i>fcgfbp-like</i>	PREDICTED: <i>Maylandia zebra</i> IgGfC-binding protein-like (LOC101479818), mRNA	8.00E-74	
19	CS	c59626_g1_i1	302	-4.53	<i>zan-like</i>	PREDICTED: zonadhesin-like [Austrofundulus limnaeus]	3.00E-54	BLASTX
					<i>fcgfbp-like</i>	PREDICTED: IgGfC-binding protein-like [Hippocampus comes]	2.00E-50	
					<i>dcc</i>	PREDICTED: <i>Fundulus heteroclitus</i> DCC netrin 1 receptor (dcc), mRNA	9.00E-04	
					<i>cngb3-like</i>	PREDICTED: <i>Poecilia reticulata</i> cyclic nucleotide-gated cation channel beta-3-like (LOC103466852), mRNA	9.00E-04	
					<i>aff1-like</i>	PREDICTED: <i>Austrofundulus limnaeus</i> AF4/FMR2 family member 1-like (LOC106513397), mRNA	9.00E-04	
20	CS	c67142_g1_i1	306	-6.36	<i>gvinp1-like</i>	PREDICTED: <i>Stegastes partitus</i> interferon-induced very large GTPase 1-like (LOC103359684), mRNA	5.00E-111	BLASTN
					<i>urgcp-like</i>	PREDICTED: <i>Stegastes partitus</i> up-regulator of cell proliferation-like (LOC103359676), mRNA	2.00E-97	
					<i>urgcp-like</i>	PREDICTED: interferon-induced very large GTPase 1-like [Stegastes partitus]	3.00E-83	
					<i>gvinp1-like</i>	PREDICTED: up-regulator of cell proliferation [Oreochromis niloticus]	2.00E-77	
					<i>srp-like</i>	PREDICTED: <i>Haplochromis burtoni</i> serine-rich adhesin for platelets-like (LOC102291168), mRNA	1.00E-31	
21	CS	c767_g2_i1	544	-3.20	<i>rp1-like</i>	PREDICTED: <i>Lates calcarifer</i> retinitis pigmentosa 1-like 1 protein (LOC108895560), mRNA	4.00E-31	BLASTN
					<i>enoph1-like</i>	PREDICTED: <i>Neolamprologus brichardi</i> enolase-phosphatase E1-like (LOC102798262), mRNA	1.00E-30	
					<i>dspp</i>	PREDICTED: <i>Pundamilia nyererei</i> dentin sialophosphoprotein-like (LOC102214334), mRNA	5.00E-30	
					<i>stm-like</i>	PREDICTED: <i>Poecilia reticulata</i> protein starmaker-like (LOC108165755), mRNA	8.00E-21	
					<i>nc12-like</i>	PREDICTED: <i>Lates calcarifer</i> nucleolin 2-like (LOC108895564), mRNA	1.00E-12	
					<i>futsch-like</i>	PREDICTED: <i>Kryptolebias marmoratus</i> microtubule-associated protein futsch-like (LOC108242481), mRNA	4.00E-12	
					<i>rp1-like</i>	PREDICTED: retinitis pigmentosa 1-like 1 protein [Lates calcarifer]	6.00E-28	
					<i>futsch-like</i>	PREDICTED: microtubule-associated protein futsch-like [Xiphophorus maculatus]	7.00E-22	
					<i>srp-like</i>	PREDICTED: serine-rich adhesin for platelets-like [Haplochromis burtoni]	6.00E-13	
					<i>dspp</i>	PREDICTED: dentin sialophosphoprotein [Oreochromis niloticus]	2.00E-11	
22	CS	c9687_g2_i1	2024	-3.24	<i>ttn1</i>	PREDICTED: titin homolog [Sinocyclocheilus grahami]	1.00E-08	BLASTX

CL (Fotoperiodo de luz continua); CS (Fotoperiodo simulado control); Trat (Tratamiento de alta expresión); Contig (Identificador de gen e isoforma del transcripto); pb (Longitud del transcripto en pares de bases); log2FC (Cambio del nivel de expresión en logaritmo en base 2 promediado de RSEM y eXpress), valores positivos indican alta expresión en el tratamiento de CL, valores negativos indican baja expresión en el tratamiento de CL; E- Value (Valor probabilístico esperado de la coincidencia de bases debida al azar); Prog (Programa de búsqueda de base de datos).



Los transcritos que no cuentan con anotaciones en las bases de datos internacionales o bien que presentaron alguna coincidencia con secuencias de otros taxones pero que demostraron valores de E-Value poco confiables, fueron clasificados como transcritos no anotados. Las secuencias de estos contigs pueden observarse en la Tabla 15. Para conocer si los transcritos pueden producir una proteína se realizó la búsqueda del marco abierto de lectura (open reading frame, ORF), con ayuda del programa ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>).

La mayoría de los transcritos presentan ORF's a excepción del transcritor c13836\_g2\_i1, el cual según el análisis no cuenta con un marco de lectura abierto (Tabla 15), lo que sugiere que este transcritor puede ser parte de la región 3'UTR, o bien que se trate de un transcritor no codificante (ncRNA). En cualquiera de los casos estos transcritos, son una fuente importante para estudios posteriores, ya que se encuentran regulados directamente por las condiciones de fotoperiodo. La carencia de información suficiente para poder identificar estos transcritos "nuevos", promueve la imperiosa necesidad de realizar la caracterización de su expresión, con potenciales descubrimientos de nuevos actores en las rutas de señalización y/o adaptación ante la exposición lumínica continua en el pez blanco de Pátzcuaro y otros vertebrados.

**Tabla 15.** Transcritos no anotados diferencialmente expresados en el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*.

Transcritos no anotados diferencialmente expresados						
No	Trat	Contig	pb	log2FC	Secuencia FASTA	ORF
1	CL	c13836_g2_i1	374	2.09	<p>&gt;c13836_g2_i1 len=374 path=[3157:0-373]</p> <p>GGATTTGAGCTGGAAATTTCTATATCTGTGTTGCAGCTGGGTGTAGTAAATGGTTATAA ATCAAAATGCTCTGTTTGGAAAAGTGATTGTAAGAGGCAGGATTCACATGAACACGATGC AGTGGTGGATGGGCTCATATTTAGGGTTGCAGCTTAAGTGTACTAGAAGTTGAAATGGA AGAAATTGAAGTAAATTAACCACTCGGCAGTGCAGTAGACACCCACATTAAGTAAATGG CTATGGGTTAACTACTACATGTAGACATCTGCCAATATGTTCCCATACCAACATA CATTGTGTTGGCAACATTGAGACTTAAATCAACCCTCAGGCCTAGATAGTAAAGAGCTG CCTGGAACAAAAAC</p>	No
2	CL	c20024_g2_i1	801	1.73	<p>&gt;c20024_g2_i1 len=801 path=[1169:0-800]</p> <p>TATTCATCCTGATTTCCCAACTACCTGTTAGTCAGAAATACACAAAAAGGACTATATTG CCCCCGCAGTTGGTCATTGTTTTATTACATGAGCAGGAGTTCTTGAGTTGCTTCAGA CCTGGTTAGTTTTCTTTTCAGAACAGTTGGCTTTTAGTTAATTTTCTATCAGGTAGTAA AAGACAGTTGGTGGCAGGGTTGAGGAACTACAACAGATTAGTTAGTGTGGTGTGAAG TCTTGTAAATGATGACAGGCTCACAGTGCAGACAGTACAGTTTATGTTTAAATGTAAGA TGCTTACTTCTTAACAGGTAGACTGTTTCTACCATTAACTCCTAACTTTTTTATTC TTTAAATTGACCCCATGTGTCCAAAAGGGGCCAAGTCTTATAGTAATAGAAATCCTGT AATGAAAACACAGAAACCACTGGGAGGAAGGTGCCGTCCGCACCCATTATTAAGGA TTCTTAAAGACCTATGCCAAATTTTCTGTATGCACAGACACTCACATAAACATTGATT TTAAGTGAGTGAACATCATGGGAAGCTTTATATCGTTACAGTCTGGGTAAAGAAATTT TGTTAGGCATTCACTCTATCAAGCTGTTGCCATGATGCTGGACAGGACAGGGTAAAGAA AAAAAATGTAGAAGTTATTTGTGAACACTCATTATAGAAAAACATGTTGAAAGAAAT AGGCTTAGAGATTGTTCTGTTTACTGAACTGCCTGCTATGCTAATGTTTAAATGTAA TTTCTTCTGAGAAGGCAAG</p>	SI
3	CL	c45592_g1_i1	423	1.89	<p>&gt;c45592_g1_i1 len=423 path=[1:0-422]</p> <p>AACAAATCTCTCCAGCCTGTATCATTTGGAATCAAGGCTAATGTTTCAATATGTACA AACCATTCATAGAACCCCTGCGGGTCAATAGGAAAGTTGGTACTTACCTGCTGTA GGAAGGCAAGGCACACCTTAGCTGAGTTGCCAATCCAAAACAGCAAAAGCAGCATGTAC AACACAGATTTGAGAACCCGCAAAAATGCATATGCAACATCTACAGAATCTCAAATTTA AAAAATTTACAGACTAATAGTGCATTTATTTGCTGTTTTCTGCACTTTTGATGTTTG GATATTTAGCTTATTTGTAATGAATTCATATAGTAACTGAAGCAAGATTTGCTGTAA ATCTGTACATACATAGTTTTATCTGTAACATGATTTCTTGCTCCTTCAATTTATTCAG</p>	SI
4	CS	c14028_g1_i1	403	-6.30	<p>&gt;c14028_g1_i1 len=403 path=[1351:0-402]</p> <p>GTCTATTTGACTCCATAAACACTACITTTTTGACTCTCTGTTAGTGTGATGCTTAAAA TCCTCAGCTGGTGTGCTGTTGTTGGCCCTGGGATGGTGCAGTGTGCAGGATCACCCA AAACTGTGCTTTGCAAAAAGAGACTGATTTGAAGGGAAAGTTGAGTAAACTGTCTC AAATCACAGAGTCCGAATGGTGGGATTTCTCAGGTGAGTTGACAATCCAGTCACT CCAACCACTAAGTGAACACCCAGGATGGAGACAGGATGCACCTGTGACTCGGCACCTTT CCAGCAGGCTGATTTGAGAGTTGTCCTCCCTTTTCTACTGAAATGAAAGATTAGTGT CTGCTGACGGCCTGCTGCTGGATGCTGGGGTTAAATAATT</p>	Si



Transcritos no anotados diferencialmente expresados					(Continuación)	
No	Trat	Contig	pb	log2FC	Secuencia FASTA	ORF
5	CS	c18896_g1_i1	337	-2.84	>c18896_g1_i1 len=337 path=[1245:0-22 954:23-336] AGGCCCGGTGGCAGAGAGCGCCGATCTGCTGGCGGCTGTGAGGGCCCTGACAGCCGGAG GCCTGGCGGTGGAGGTGGCCGGAGCCCGGAGTTCGAGGAGAGTCTGGGGGGGGCCGAGG CCGCGGGGGGGCTGATCCAGACCTCCTGGAGCCGGAGGCCCTGGAGGCCACCCAGAGG AGTCAGTGGCGGAGACCTCTGAGGAGCGCGCGTGGTTTCAAACGAGGAGGAGGTGACAT CTGCAGGGGGGAGGAGTGTGGCAGAGGATGCTCCTGCTCCATCTGAAGCCAGGAGG AGGCGCCAACGAGTCTGTTTCAGCCCAAGAGGAGGA	SI
6	CS	c22182_g1_i1	803	-1.86	>c22182_g1_i1 len=803 path=[1373:0-189 1563:190-190 96:191-802] GGTCTTGAAAAGAGAGATTGTTAATTAGACAAAAAGTCAAAGAAACGGATGTAAGATAA AAATAAAGGCCAGTCAGATGTATTAACAAGCTTGAATGCTCACGTTCTGCTCTGAAAA CAACAGAACAGATTTCTCAGTACTATGATCTGCTGCTTCAACAGCTTCTCTCCATT TGTGTTTTCCAGGTTTTCGTGGCTGCTGTGAGGAAGAAGAAATCAAACATGGCTGCTGT GTCCATAAAGTAAACCAATCATCAAGATGGCTGCTGTACACCTCTTGAACCTCAA ACAACAGCTAGCTGAGTGGTATTACATAATGTTAAAGTAGCCGGGAATTTCTCT CTGCCCCCTTGTGCTTTTTTGCACACCTTTCTTAATCTATAAAGACACAGAGTCTCC CCGCTGCCAGTAAAGAAAAAGCCACTAAATGGAATTATCAGGCTATCGGTGAACAT GGGACGCTCGCTCTTGTAGCTTTAATGAGACTAGCAGGACTTTTTGCTGCTCAGG GTCACATAGAAGCCACTCACTTTAAATCCTGACTGTGCTGCAAAACAGCAAGGATCCGA ATCTTCAAACATCCCTCATCCATCGTCAACTGTAATTTGATTGAATTCATTATCAG CTTTTGAAGAACTGCTTCTTGAAGTGGCTTACTGTACACATTTAAAGGTGCTGAC TGTGCTCTTCAAATATGTATAACTTTAATGTAACAGCATAATATTTCAATAAA GAAAAATCTGATTCAAAAAAA	Si
7	CS	c25404_g2_i1	432	-2.22	>c25404_g2_i1 len=432 path=[2806:0-431] TTTTTTTTTTTTCTTTTTCTTTCGCCACATGACAGAACTAAGTGTACTTTTATCATCA GAGGCTCTTTTGCATTGACTTTTGGTGAAGATGGGAGAGCTCTGCTTCTAGTGGC CTGCAGCTGGACCAATAAGACGCTCAGAGCAGAAGACATGGCTGCAAAACAGATGCTA CGACTCGCGGAGGAGCAGTCCACAGCGTTTTACTTACCAGGCTGAAGGAGGACCAAGG ACACAGTCAGAGGCTGAGTTTAAAGGAAACTTTGTTTTTTTTCTTCTCGGTGACGGATGC TGTTGTTTTTGGACACGCCACTTCAAACCTCAAATAAAAGCTGAAGAGAGAATCATCT TTGAAGTTTTTATTGAAGGTTTTTGTTTTTTTGTTAAGCTTGAAGTGTCTGTTTTAT TGATTTAAGG	SI
8	CS	c2560_g1_i1	457	-2.23	>c2560_g1_i1 len=457 path=[453:0-335 807:336-456] ATTACAGATTTGAAAGAACTCATGTTACAGATAGGAATAATACATTTTGTGTTTTTTTTGT TGTTGTCATCATGTTTGGTCTTAACTTTACCTTTAGTAATGGCCACCATGTTACATCT AGGCTTGAATCTTAAACCTCGATTTCCGTTGTGCTTTGGAAGATAATGAACAAGTT TCCCCCAACCATTAAGTCATGATGTTGAATAGTTGAGGAAAAAATCCCCCAATAAG CATAATCTTTACCACCATGAATCCAACTGACACAGGCTCTGGAAGTGTACATTCAGCT AACAGAGAATCTGGCACCTAGTGGAAAAACACACATTTGATCTGCTTGGTAAATATT ATAGGATTATACAAGCTATGTTATTTGATGTTGAAACTCATTTCAGCAGCTGTCATGT TACAGTGGCTTTACATTTACATCCATTGAGGCCTG	Si
9	CS	c28505_g1_i1	834	-2.82	>c28505_g1_i1 len=834 path=[912:0-833] CCTAAGCACCAGCACCCTCCTCCCTTGGTCTTCCCCCTTATCCTAACCACAACCT CCTCCTCACCTGAAACATTTTCTTTATGCCATCCCCCACCCTCAACTTCTCCAGA CAGGTGACACTGACAACCGCCTGGGAGAGCTACAACCAGACAGACAAAACATGATTTCC TGAACAAGGGCTCCATCTCCTGACCAAAACATAGAAACACACTTACTTACCTCAATACTT ACCTTCTTCTTTTACCTGTACAGCATCACCGCTCCTCAGGACCCACACACCTGGAC CACCGTCATAATACGAACCTGAAAAAGACAAAATACACTTACCTAGACAGTAACCTCTAC TCACCTGCCCTAATAACAACCTCATCTTACCAGCTTAATAGCAGACGAAACACCTTGACC TGGACTGGACCTTTTTTCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTGAT GTCAGTCCGTTGAGACCCGATAGGAGGCGCTCCTGGCTGAGTCTGGTCCCAAAATTTG GAGTGAGGACGTGACACATGATGAAACCGGAAACCTGCCCGCAAGGAATGACGTGGGACC AACCCAGCAGGACCTAAGCTCAGCCACTCCATGTCAGCAGATGCACGTCTGGGACG ACGGAGAGGCTGCTCCTGACGACTTACTTCCCAAACCTCACTTGTCTGCAAGCT CCGCTGATGAAGATCTCTTAATAGAGATCGAAACGTCGCGGATTTAAGCTTGCATTT TGATTTATTTATTTTATTTTGTAAATAAAGTACTTTTTTCAGTCAAAAAAAA	Si
10	CS	c28614_g1_i1	488	-2.38	>c28614_g1_i1 len=488 path=[1201:0-19 1117:20-349 1086:350-487] GGGGGGGGGGGGGGGGGAGCCGGATCCAGCCCCCGTTTTTCAGCCTTCTGGGAGA AAACGAGTGGTGAACATATCAAATAAAGCAGTTTTTGGAGGAACTTCAACGACTCT TTGAATGTTGGAAGTTTTCTGTTTTTATGGAGCTCCAAGAACATTTCTCTCATCAGAG ACATCCCGGCCGATTAGAATTCCTGAGATGGACTAAAAAGATCGGTGAATTAGCGATGA TAGTTCGATAAGAGTAAATTAAGCTTATTTAGAGCTTTTGTGAGATTGACCAAGA TTTTCATTTTTGCGCATTCAGTAAAAACTGTTTTTTTTAATGTTTTTCAAATAATGGATT TTCTAATGATGAACACATTAAGAACACTGAATATACTGACTACGGGATTTCTGTTGACGTT TGCTTACATTTATGACTCTTACATTTCAACAAACGAAAAATGAAAAATAATCAATAG CATATCAG	Si
11	CS	c6958_g2_i1	406	-3.82	>c6958_g2_i1 len=406 path=[794:0-405] GCTGGCCACCGCTCACGCTTTGACAGCGGGTCAAACCTCGCCACCGAGGAAAGCAGGAAGT AAACGACTCACCGCGCCGACCGGTACCCCGCGGTGGAGCGGAGCCAGCCAGGCAAAAG AGCAGTGTGACCAGAAACAGGATCAGTGTCCAGTCAGATTCAAACAAAGAGAGAGAC GGAGACAGAAAGGAGTGAACAGAGATCCAGAGGGGGAGGGAGTCCCGACTACTCAGCT GAACGGAGCTGAAACTCAACAAAGACTCTGACTCTGGTCCACTCTGACCCGGGTCC TGAGAGTCCGTGGTCAAATGTGCTGGACTGACTCCTTCTCCTGACAGCGCGGTGCA AACCGAGGCCGAGACTCTCGGGAGGGGGCGGGACGGAAGCGGG	SI

CL (Fotoperiodo de luz continua); CS (Fotoperiodo simulado control); Trat (Tratamiento de alta expresión); Contig (Identificador de gen e isoforma del transcrito); pb (Longitud del transcrito en pares de bases); log2FC (Cambio del nivel de expresión en logaritmo en base 2 promediado de RSEM y eXpress), valores positivos indican alta expresión en el tratamiento de CL, valores negativos indican baja expresión en el tratamiento de CL; ORF (Marco abierto de lectura).

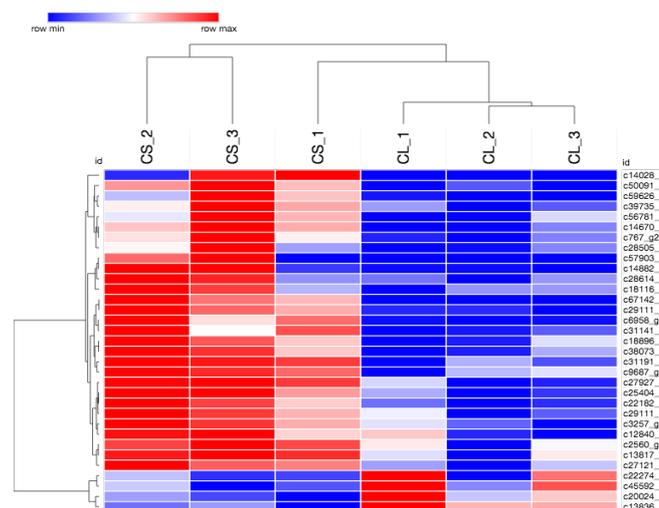
Una vez clasificados cada uno de los transcritos diferencialmente expresados, se promediaron los valores de los niveles de expresión obtenidos de RSEM y eXpress. Con estos promedios se realizaron gráficas (heat map) con ayuda del programa morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>), en estas



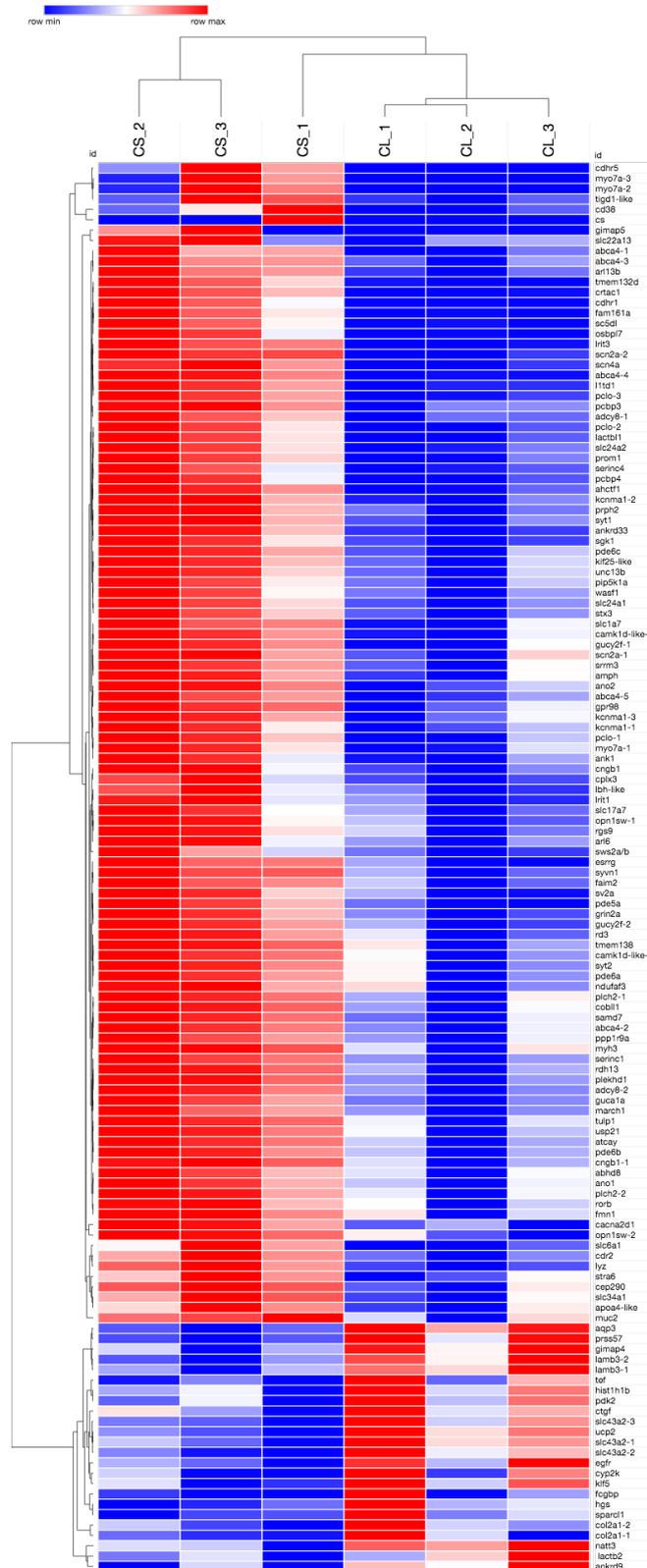
gráficas pueden distinguirse visualmente los valores de expresión de los transcritos en cada tratamiento. En la Figura 37 se observan los niveles de expresión de los transcritos ambiguos/no anotados y en la Figura 38 se observan los niveles de expresión de transcritos con anotación funcional (genes) para cada una de las muestras (n=6). Cuando los transcritos/genes presentan altos niveles de expresión se observan en color rojo y cuando presentan baja expresión se identifican con el color azul.

El dendrograma de la porción izquierda de las figuras agrupan a los transcritos de acuerdo a sus niveles de expresión. Como se observa en la parte baja de la Figura 37 existen 4 transcritos (c22274\_g1, c45592\_g1, c20024\_g2, c13836\_g2) y en la parte baja de la Figura 38 existen 24 transcritos anotados (aqp3-ankrd9) que presentan altos niveles de expresión en las muestras del fotoperiodo de luz continua y bajos niveles de expresión para las muestras del fotoperiodo simulado control. Estas secuencias se agrupan de manera diferenciada de los demás transcritos, lo que genera dos grandes grupos que concuerdan con los transcritos diferencialmente expresados en los tratamientos de CL y CS, por lo que estas gráficas indican claramente los grupos y niveles de expresión de los transcritos para cada una de las muestras.

Al analizar el agrupamiento de los niveles de expresión por cada muestra (parte superior de las Figuras 37 y 38), se observa en ambas gráficas que las tres muestras de luz continua (CL\_1, CL\_2 y CL\_3) forman un grupo bien definido al cual se le adhiere la muestra de CS\_1, esto sugiere que los niveles de expresión diferencial de esta muestra son más similares a las muestras del tratamiento de luz continua que al fotoperiodo simulado control.



**Figura 37.** Gráfica tipo heatmap de los niveles de expresión (log<sub>2</sub>) de los transcritos ambiguos y no anotados diferencialmente expresados en el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*. CL (Fotoperiodo de luz continua); CS (Fotoperiodo simulado control).

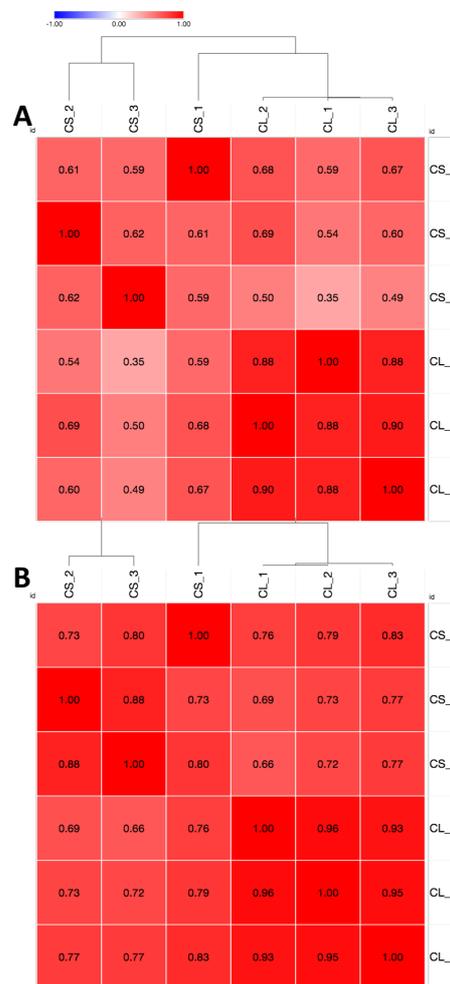


**Figura 38.** Gráfica tipo heatmap de los niveles de expresión ( $\log_2$ ) de los transcritos anotados diferencialmente expresados en el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*. CL (Fotoperiodo de luz continua); CS (Fotoperiodo simulado control).



Cabe mencionar que tanto en la Figura 37 como la Figura 38, se advierte que para los transcritos de alta expresión en las condiciones de luz continua, la muestra CL\_2 presenta un patrón diferente a las muestras CL\_1 y CL\_3; condiciones similares ocurren para la muestra CS\_1 vs CS\_2 y CS\_3 en los transcritos de alta expresión del fotoperiodo simulado control.

Estas observaciones sugieren que a pesar de que los transcritos se identifican diferencialmente expresados de manera global, existen variaciones que se deben posiblemente a la respuesta biológica intrínseca de cada organismo ante las condiciones de fotoperiodo. Para conocer las diferencias estadísticas en los patrones de expresión, se realizó un análisis de correlación de Pearson entre los niveles de expresión de las muestras.



**Figura 39.** Matriz de correlación de los niveles de expresión (log2) de los transcritos diferencialmente expresados entre las muestras del pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*. CL (Fotoperiodo de luz continua); CS (Fotoperiodo simulado control). A) Matriz de correlación de transcritos ambiguos y no anotados; B) Matriz de correlación de transcritos anotados.

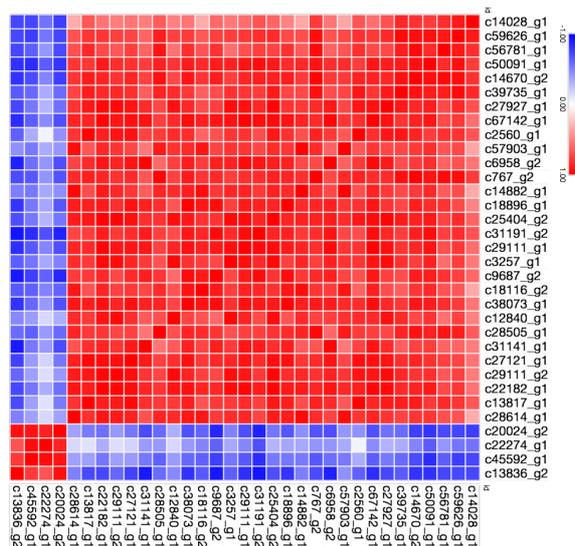
En la Figura 39 se indican los valores de correlación obtenidos con el programa Morpheus, tanto para los transcritos ambiguos y no anotados (A) como para



los transcritos anotados (B); en ambos casos se observa que los valores de correlación entre las muestras de luz continua es mayor que entre las muestras del fotoperiodo simulado control, con valores de 0.88-0.90 (CL vs CL) y de 0.59-0.62 (CS vs CS) para los transcritos ambiguos y no anotados (Figura 39-A); así como de 0.93-0.96 (CL vs CL) y 0.73-0.88 (CS vs CS) para los transcritos anotados (Figura 39-B).

Estos resultados indican que las condiciones de iluminación continua, modulan con una mayor correlación estadística, los niveles de expresión de los transcritos diferencialmente expresados en esta condición experimental, en contraste con los transcritos del fotoperiodo simulado control; lo que sugiere que el tratamiento de CL modula de manera efectiva los niveles de expresión entre las muestras, mientras que en el tratamiento de CS se presenta un menor control en los niveles de expresión de las muestras.

Adicionalmente, para analizar la correlación de los niveles de expresión entre los transcritos, se realizó la matriz de correlación de los transcritos ambiguos y no anotados (Figura 40) y de los transcritos anotados (Figura 41) con el programa Morpheus. En ambas gráficas se observa que existe una alta correlación (color rojo) de los transcritos altamente expresados para una misma condición experimental (CS vs CS; CL vs CL), así como una baja correlación (color azul) entre los transcritos altamente expresados en el fotoperiodo simulado control vs los transcritos altamente expresados en luz continua (CS vs CL). Estos resultados confirman la presencia de dos grandes grupos de transcritos que son mutuamente excluyentes en los niveles de expresión entre tratamientos, lo que brinda soporte a los resultados del análisis de expresión diferencial realizado.



**Figura 40.** Matriz de correlación de los niveles de expresión ( $\log_2$ ) de los transcritos ambiguos y no anotados diferencialmente expresados en las muestras del pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*.

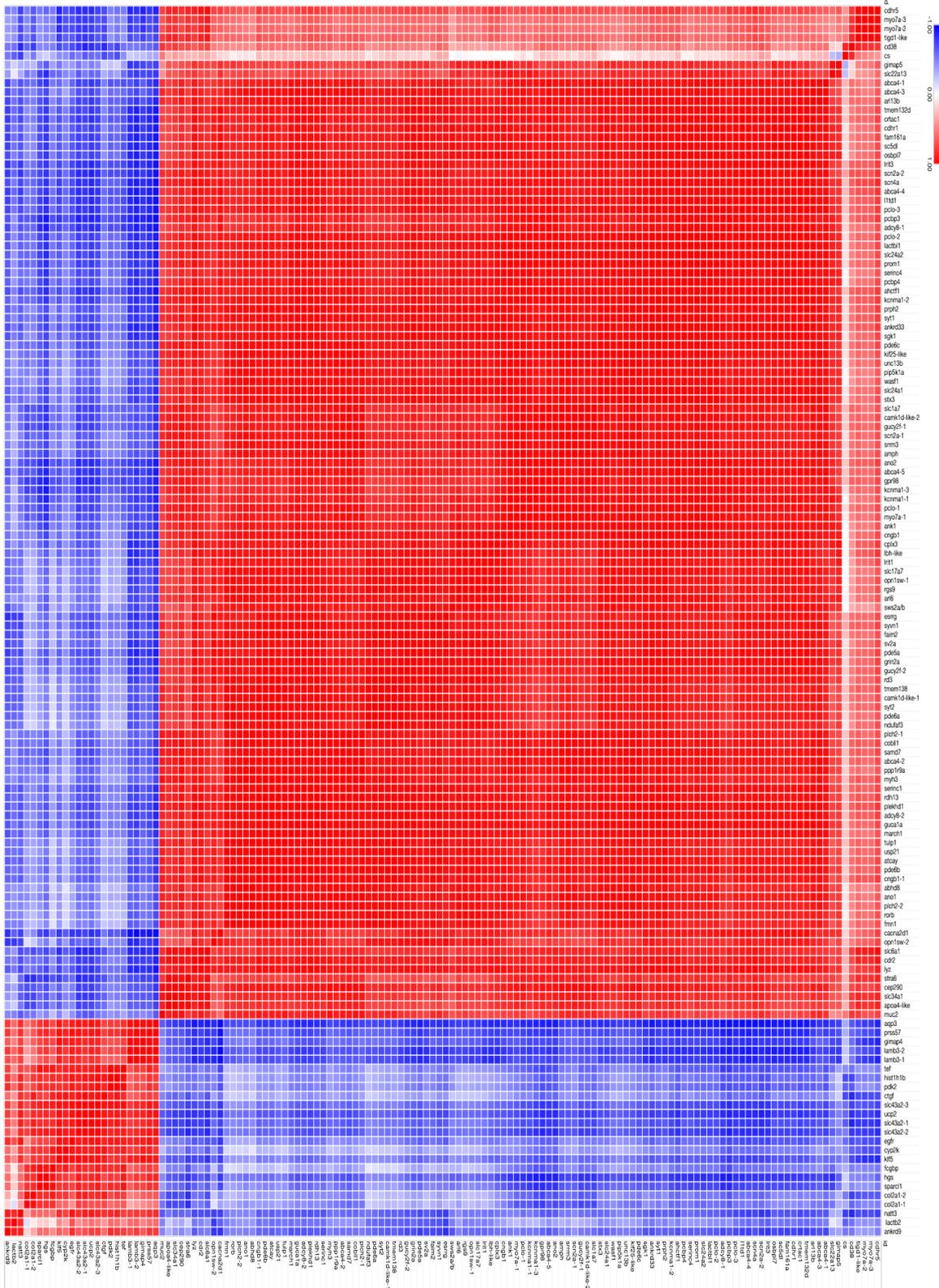
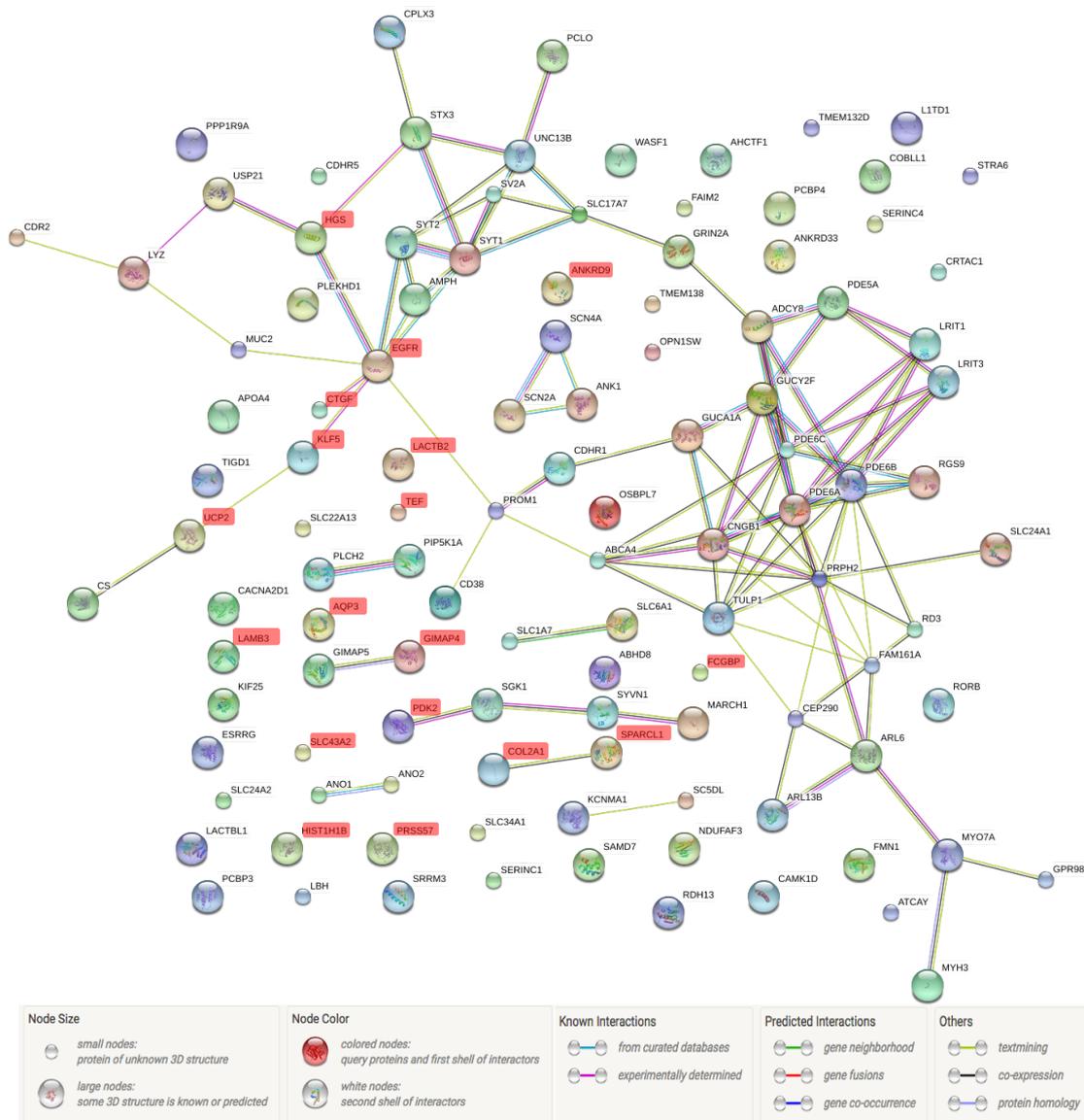


Figura 41. Matriz de correlación de los niveles de expresión (log<sub>2</sub>) de los transcritos anotados diferencialmente expresados en las muestras del pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*.

### 3.3.3.3. Análisis de enriquecimiento e identificación de procesos biológicos de genes/proteínas diferencialmente expresadas

Una vez caracterizados los niveles de expresión diferencial y su correlación, se procedió a realizar un análisis String v10.5 (<https://string-db.org/>) con los transcritos anotados diferencialmente expresados, son el uso de la base de datos para *Homo sapiens*. En este análisis se obtuvo una gráfica de interacción proteína-proteína (Figura 42) y una tabla de enriquecimiento para términos de GO (Procesos biológicos, funciones moleculares, componente celular) y procesos biológicos de Kegg (Tabla 16).



**Figura 42.** Análisis de interacción proteína-proteína de los transcritos anotados diferencialmente expresados en las muestras del pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*. Los nombres de las proteínas en color rojo indican las proteínas que presentan alta expresión en condiciones de luz continua.



En la Figura 42 se observan 112 proteínas anotadas, de las cuales 94 proteínas se encuentran con alta expresión en el tratamiento de CS y 18 proteínas se encuentran con alta expresión en CL. Cabe mencionar que en este tratamiento existen dos proteínas que no pudieron ser identificadas por la base de datos de String, tal es el caso de Cyp2k (Cytochrome P450 2K1-like) y Natt3 (Natterin-3 like). En el tratamiento de CS no se identificó la proteína Sws2a/b (Short-wavelength sensitive opsin 2A beta and short-wavelength sensitive opsin 2B) probablemente debido a que son secuencias exclusivas de peces.

En la Figura 42 se observa una red central de 46 proteínas (41 CS/5 CL) con 93 interacciones y 8 redes aisladas con 12 interacciones de 19 proteínas (15 CS/4 CL). Además, se observa que 47 proteínas (38 CS/9 CL) no presentan interacciones. Estos resultados indican que en el 41.96% de los genes/proteínas que se encuentran diferencialmente expresados se desconoce sus interacciones. También es importante mencionar que de las 112 proteínas identificadas por la base de datos de String, 34 proteínas (17 con interacción/17 sin interacción) no presentan estructura 3-D conocida, por lo que existe una carencia de información en las bases de datos actuales que imposibilitan conocer las interacciones y estructuras proteicas en su totalidad.

El análisis de enriquecimiento estadístico, en términos de GO/Kegg (FDR  $\leq$  0.05), indica que estos genes/proteínas diferencialmente expresadas están relacionadas con 96 términos de procesos biológicos, 27 términos de funciones moleculares, 38 términos de componentes celulares y 3 procesos biológicos de Kegg.

Dentro de los procesos biológicos más importantes en los que participan estos genes/proteínas con alta expresión en el tratamiento control (CS) se encuentran los procesos homeostáticos, de desarrollo celular, anatómico y nervioso, desarrollo retinal y de fotorreceptores, sistema neurológico, respuesta a estímulos externos, detección de luz visible, fototransducción, diferenciación neuronal, transporte de vesículas sinápticas, iones, calcio, sodio, aminoácidos y ácido carboxílico, entre otros (Tabla 16).

Para las funciones moleculares se encuentran transporte transmembranal de iones, calcio, sodio, aminoácidos y ácido carboxílico, actividad de canales iónicos activados por voltaje, unión a cGMP (Guanosin monofosfato cíclico), actividad de liasas Fósforo-Oxígeno y fosfodiesterasa, entre otros.

En la sección de componentes celulares observamos los términos relacionados con las partes de axón, zona presináptica y cilios, membranas de cilios, discos fotorreceptores, de orgánulos, de vesículas sinápticas y plasmática, gránulos cromafines, unión y periferia celular, entre otros (Tabla 16). Para los procesos biológicos de Kegg, se distingue una incidencia estadística en el metabolismo de purinas, ciclo de vesículas sinápticas y fototransducción (Tabla 16).



**Tabla 16.** Análisis de enriquecimiento en términos de GO (Gene ontology) y procesos biológicos de Kegg de los genes/proteínas diferencialmente expresados en el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*.

Análisis de enriquecimiento de los genes/proteínas diferencialmente expresados en términos de Gene Ontology (GO) para procesos biológicos				Análisis de enriquecimiento de los genes/proteínas diferencialmente expresados en términos de Gene Ontology (GO) para funciones moleculares			
ID	Descripción	Número de genes	FDR	ID	Descripción	Número de genes	FDR
GO:0003333	amino acid transmembrane transport	6	6.64E-04	GO:0047555	3,5-cyclic-GMP phosphodiesterase activity	4	7.17E-04
GO:0006869	amino acid transport	6	5.07E-03	GO:0015171	amino acid transmembrane transporter activity	6	2.80E-03
GO:0048956	anatomical structure development	38	7.52E-03	GO:0043168	anion binding	27	4.93E-02
GO:0060249	anatomical structure homeostasis	10	6.85E-04	GO:0008509	anion transmembrane transporter activity	7	3.33E-02
GO:0006828	anion transport	10	1.96E-02	GO:0008273	calcium, potassium:sodium antiporter activity	2	3.78E-02
GO:0043016	camera-type eye development	11	2.27E-04	GO:0046945	carboxylic acid transmembrane transporter activity	5	3.52E-02
GO:0048593	camera-type eye morphogenesis	5	3.47E-04	GO:0008324	cation channel activity	8	3.53E-03
GO:0060219	camera-type eye photoreceptor cell differentiation	3	1.39E-02	GO:0030553	cation transmembrane transporter activity	14	3.53E-03
GO:0046942	carboxylic acid transport	7	2.44E-02	GO:0022836	cGMP binding	3	1.58E-02
GO:0008655	cation transmembrane transport	14	9.19E-04	GO:0022836	gated channel activity	8	3.40E-02
GO:0006812	cation transport	18	4.43E-05	GO:0043167	ion binding	49	3.40E-02
GO:0048468	cell development	19	4.73E-02	GO:0005216	ion channel activity	9	2.42E-02
GO:0030031	cell projection assembly	7	4.73E-02	GO:0015075	ion transmembrane transporter activity	14	1.13E-02
GO:0030030	cell projection organization	21	1.72E-05	GO:0015179	L-amino acid transmembrane transporter activity	5	3.53E-03
GO:0022607	cellular component assembly	22	1.13E-02	GO:0046873	metal ion transmembrane transporter activity	9	3.40E-02
GO:0044085	cellular component biogenesis	22	3.29E-02	GO:0015077	monovalent inorganic cation transmembrane transporter activity	9	1.83E-02
GO:0048869	cellular developmental process	30	4.97E-02	GO:0008081	phosphoric diester hydrolase activity	5	1.83E-02
GO:0071214	cellular response to abiotic stimulus	8	1.18E-02	GO:0016849	phosphorus-oxygen lyase activity	3	3.25E-02
GO:0009582	detection of abiotic stimulus	14	1.40E-09	GO:0015081	sodium ion transmembrane transporter activity	7	3.73E-03
GO:0009581	detection of external stimulus	14	1.29E-09	GO:0022838	substrate-specific channel activity	10	1.10E-02
GO:0050908	detection of light stimulus involved in visual perception	3	1.61E-02	GO:0022891	substrate-specific transmembrane transporter activity	15	2.72E-03
GO:0051606	detection of stimulus	15	8.76E-04	GO:0022892	substrate-specific transporter activity	16	1.10E-02
GO:0009584	detection of visible light	12	1.09E-09	GO:0015293	symporter activity	6	2.38E-02
GO:0032502	developmental process	42	4.79E-03	GO:0022857	transmembrane transporter activity	16	5.46E-03
GO:0051234	establishment of localization	35	4.51E-03	GO:0005215	transporter activity	18	7.22E-03
GO:0051650	establishment of vesicle localization	8	1.54E-03	GO:0022843	voltage-gated cation channel activity	6	2.53E-02
GO:0001654	eye development	10	2.51E-03	GO:0005244	voltage-gated ion channel activity	7	1.36E-02
GO:0048592	eye morphogenesis	8	3.59E-04				
GO:0042462	eye photoreceptor cell development	5	2.29E-04				
GO:0001754	eye photoreceptor cell differentiation	6	5.94E-05				
GO:0048699	generation of neurons	21	8.76E-04				
GO:0014047	glutamate secretion	4	3.15E-03				
GO:0042592	homeostatic process	21	7.57E-04				
GO:0098660	inorganic ion transmembrane transport	11	2.83E-02				
GO:0034220	ion transmembrane transport	16	1.23E-03				
GO:0006811	ion transport	20	4.15E-04				
GO:1902475	L-alpha-amino acid transmembrane transport	5	1.54E-03				
GO:0015807	L-amino acid transport	4	3.23E-02				
GO:0007611	learning or memory	8	3.34E-03				
GO:0030001	metal ion transport	12	9.67E-03				
GO:0050804	modulation of synaptic transmission	7	4.20E-02				
GO:0015672	monovalent inorganic cation transport	12	9.19E-04				
GO:0007275	multicellular organismal development	40	1.65E-03				
GO:0048871	multicellular organismal homeostasis	11	8.91E-05				
GO:0007399	nervous system development	24	6.85E-03				
GO:0003407	neural retina development	4	1.63E-02				
GO:0050877	neurological system process	29	2.02E-09				
GO:0048666	neuron development	15	3.15E-03				
GO:0030182	neuron differentiation	18	7.18E-04				
GO:0007269	neurotransmitter secretion	8	8.91E-05				
GO:0006836	neurotransmitter transport	7	3.02E-03				
GO:0071705	nitrogen compound transport	11	6.08E-03				
GO:0051640	organelle localization	9	1.49E-02				
GO:0071702	organic substance transport	22	1.96E-02				
GO:0042461	photoreceptor cell development	6	2.91E-05				
GO:0046530	photoreceptor cell differentiation	7	6.86E-06				
GO:0045494	photoreceptor cell maintenance	7	1.37E-06				
GO:0007603	phototransduction, visible light	12	3.49E-10				
GO:0065008	regulation of biological quality	32	3.15E-03				
GO:0032879	regulation of localization	26	7.52E-03				
GO:0042391	regulation of membrane potential	9	3.28E-03				
GO:0001505	regulation of neurotransmitter levels	7	3.11E-03				
GO:0022400	regulation of rhodopsin mediated signaling pathway	6	2.27E-05				
GO:0051049	regulation of transport	24	1.22E-03				
GO:0009628	response to abiotic stimulus	21	8.91E-05				
GO:0007308	response to alcohol	8	3.51E-02				
GO:0051592	response to calcium ion	5	4.31E-02				
GO:0009605	response to external stimulus	25	1.38E-03				
GO:0009416	response to light stimulus	14	2.34E-06				
GO:0060041	retina development in camera-type eye	10	3.05E-06				
GO:0001895	retina homeostasis	6	6.64E-04				
GO:0060042	retina morphogenesis in camera-type eye	4	1.63E-02				
GO:0016056	rhodopsin mediated signaling pathway	7	1.87E-06				
GO:0007423	sensory organ development	12	2.77E-03				
GO:0009596	sensory organ morphogenesis	8	8.21E-03				
GO:0007600	sensory perception	20	2.91E-06				
GO:0023061	signal release	7	8.84E-03				
GO:0044707	single-multicellular organism process	43	4.62E-02				
GO:0044708	single-organism behavior	9	3.03E-02				
GO:1902580	single-organism cellular localization	14	1.44E-02				
GO:0044767	single-organism developmental process	43	2.07E-03				
GO:1902578	single-organism localization	31	8.84E-03				
GO:0044765	single-organism transport	30	7.52E-03				
GO:0035725	sodium ion transmembrane transport	7	1.88E-03				
GO:0006814	sodium ion transport	9	1.66E-04				
GO:0048488	synaptic vesicle endocytosis	3	2.13E-02				
GO:0016079	synaptic vesicle exocytosis	5	4.96E-03				
GO:0097479	synaptic vesicle localization	6	4.39E-03				
GO:0036465	synaptic vesicle recycling	3	3.50E-02				
GO:0048489	synaptic vesicle transport	6	3.98E-03				
GO:0048731	system development	36	2.67E-03				
GO:0003008	system process	32	2.85E-08				
GO:0001894	tissue homeostasis	9	1.69E-04				
GO:0055085	transmembrane transport	17	4.96E-03				
GO:0006810	transport	32	2.47E-02				
GO:0007601	visual perception	19	1.20E-14				

Análisis de enriquecimiento de los genes/proteínas diferencialmente expresados en términos de Gene Ontology (GO) para componentes celulares			
ID	Descripción	Número de genes	FDR
GO:0016324	apical plasma membrane	7	2.56E-02
GO:0030424	axon	9	8.49E-03
GO:0033267	axon part	6	1.53E-02
GO:0098588	bounding membrane of organelle	28	5.71E-04
GO:0030054	cell junction	19	2.95E-04
GO:0071944	cell periphery	46	9.15E-05
GO:0042995	cell projection	28	1.54E-06
GO:0031253	cell projection membrane	15	3.29E-09
GO:0044463	cell projection part	25	3.11E-10
GO:0042583	chromaffin granule	2	1.47E-02
GO:0042584	chromaffin granule membrane	2	9.98E-03
GO:0060170	ciliary membrane	11	6.38E-11
GO:0044441	ciliary part	12	4.34E-06
GO:0005929	cilium	15	1.06E-06
GO:0060199	clathrin-sculpted glutamate transport vesicle	2	9.98E-03
GO:0060203	clathrin-sculpted glutamate transport vesicle membrane	2	9.98E-03
GO:0016020	membrane	62	1.03E-02
GO:0098589	membrane region	24	1.26E-07
GO:0097458	neuron part	23	1.06E-06
GO:0031513	nonmotile primary cilium	14	2.39E-12
GO:0031090	organelle membrane	32	1.97E-03
GO:0032391	photoreceptor connecting cilium	3	2.57E-02
GO:0097381	photoreceptor disc membrane	5	1.76E-06
GO:0001917	photoreceptor inner segment	4	3.64E-03
GO:0001750	photoreceptor outer segment	14	2.30E-15
GO:0042622	photoreceptor outer segment membrane	3	4.93E-03
GO:0005886	plasma membrane	46	6.27E-05
GO:0044459	plasma membrane part	27	1.97E-03
GO:0098590	plasma membrane region	23	2.37E-08
GO:0098793	presynapse	6	3.73E-03
GO:0048786	presynaptic active zone	3	1.47E-02
GO:0072372	primary cilium	16	1.88E-12
GO:0002198	stereocilia coupling link	2	1.47E-02
GO:0002420	stereocilium	3	2.46E-02
GO:0045202	synapse	13	1.97E-03
GO:0030672	synaptic vesicle membrane	4	9.98E-03
GO:1902495	transmembrane transporter complex	7	4.34E-02
GO:0098805	whole membrane	29	4.34E-06

Análisis de enriquecimiento de los genes/proteínas diferencialmente expresados en términos de procesos biológicos Kegg			
ID	Descripción	Número de genes	FDR
230	Purine metabolism	6	2.66E-02
4721	Synaptic vesicle cycle	5	2.77E-03
4744	Phototransduction	6	1.10E-06

ID (Identificador de términos GO/Kegg); FDR (False discovery rate).



En conjunto estos resultados indican que en el tratamiento de iluminación continua, existiría una baja producción de proteínas relacionadas con la actividad de fototransducción, sinapsis neuronal, metabolismo de cGMP, ácido carboxílico y aminoácidos; lo que sugiere que en el tratamiento de CL existen adaptaciones biológicas importantes para sobrevivir a las condiciones de iluminación constante.

Adicionalmente las proteínas con alta expresión del tratamiento de CL (Ctgf-Egfr-Hgs-Klf5-Ucp2) incluidas en la red central (Figura 42), se encuentran involucradas en procesos de proliferación celular, control transcripcional y respuesta ante condiciones de estrés oxidativo, con valores de cambio en niveles de expresión log<sub>2</sub>FC de 1.19, 1.25, 3.09, 1.33 y 1.60 respectivamente (Tabla 17). El factor de transcripción Klf5 (Kruppel-like factor 5) esta vinculado directamente a Ucp2 y a Egfr (Epidermal growth factor receptor), lo que sugiere que Klf5 puede ser uno de los genes claves en el control transcripcional para el proceso de crecimiento (Egfr-Hgs-Ctgf) y el control de la producción energética (Ucp2).

Además, de las proteínas incluidas en la red central para el tratamiento de CL, se observan otras vinculadas con el crecimiento celular, como Sparcl1 (Proliferation-Inducing Protein 33), implicada en la regulación de la adhesión, migración y proliferación celular (log<sub>2</sub>FC, 2.66); Col2a1 (Collagen, type II, alpha 1) con un valor de log<sub>2</sub>FC de 2.95, relacionada con el desarrollo esquelético, de cartílagos, de crecimiento, de adhesión celular e interacción con la matriz extracelular; Lamb3 (Laminin, beta 3) con un log<sub>2</sub>FC de 2.12, involucrada en la adhesión, migración y organización de las células en interacción con otros componentes de la matriz extracelular (Tabla 17).

Aunado a estas proteínas se encuentra *Slc43a2* (Solute carrier family 43, member 2) con un log<sub>2</sub>FC de 1.73, que participa en el transporte transmembranal de aminoácidos neutrales (G,A,I,V,L,F,P,M,S,T,C,Q,N,W), crecimiento y proliferación celular a través de la activación del mTORC1 (mechanistic target of rapamycin complex 1); Aqp3 (Aquaporin 3), la cual se requiere para la señalización de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Peróxido de Hidrógeno) en la estimulación del crecimiento (log<sub>2</sub>FC, 1.74); Hist1h1b (Histone cluster 1, H1b) con un log<sub>2</sub>FC de 1.28, que actúa como regulador de la transcripción de genes por remodelación de la cromatina, en condiciones de estrés oxidativo promueve el crecimiento celular y activa a Sirtuina 1, que a su vez esta relacionada con la activación de los genes circadianos *Clock* y *Bmal/Npas2*, así como la producción de NAD<sup>+</sup> (Tabla 17).

En la Figura 42 se observa que Ucp2 (Uncoupling protein 2) exhibe una interacción con Citrato Sintetasa. Ambas proteínas son claves en la regulación de la producción energética y de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la mitocondria. En los organismos expuestos al tratamiento de luz continua se observa una alta expresión de Ucp2, pero una baja expresión de Citrato Sintetasa (log<sub>2</sub>FC, -10.86) y de Ndufaf3 (NADH dehydrogenase (ubiquinone)



complex I, assembly factor 3), la cual es una proteína esencial en la cadena transportadora de electrones ( $\log_2FC$ , -1.26) (Tabla 17). Lo que sugiere una disminución de la actividad del ácido tricarbóxico, producción de ATP y de ROS en comparación con los organismos que se encuentran en el fotoperiodo simulado control.

Otra de las proteínas relacionadas con el control negativo de producción de energía aerobia es Pdk2 (Pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 2), la cual también se encuentra con altos niveles de expresión ( $\log_2FC$ , 1.13) en el tratamiento de CL (Figura 42), lo que sugiere una regulación a la baja de la formación de acetil-coenzima A y de la actividad del ciclo del ácido tricarbóxico con la consecuente baja producción de ROS. La proteína Pdk2 esta directamente relacionada con Sgk1 (Serum / glucocorticoid regulated kinase 1) que se encuentra con altos niveles de expresión ( $\log_2FC$ , -1.37) en el tratamiento de CS, esta proteína se encuentra relacionada con procesos de apoptosis (Tabla 17), lo que sugiere que en las condiciones de luz continua podría existir una disminución de este tipo de procesos de muerte celular.

En el tratamiento de CL (Figura 42), se encuentran otras proteínas con altos niveles de expresión relacionadas con la supervivencia celular, entre ellas observamos: Ankrd9 (Ankyrin repeat domain 9) involucrada en la regulación negativa de procesos de apoptosis; Lactb2 (Lactamase Beta 2) requerida para el buen funcionamiento mitocondrial y viabilidad celular; Tef (Thyrotroph embryonic factor) que es un factor de transcripción que puede inducir reparación de DNA, inhibir procesos de apoptosis, regular genes circadianos (Rora,b; Nr1d1,2; Per 1,2) a través de secuencias D-box y activar el promotor de Tshb (Thyroid Stimulating Hormone Beta); estas presentan valores de  $\log_2FC$  de 1.35, 1.64 y 1.32 respectivamente (Tabla 17).

Una de las proteínas que no fueron identificadas en el análisis String y es altamente expresada en los organismos de luz continua es Cyp2k (Cytochrome P450 2K), la cual se encuentra relacionada con procesos de reparación de lípidos peroxidados y que presenta un valor de  $\log_2FC$  de 1.85 (Tabla 17). En conjunto estos resultados sugieren la activación de una multiplicidad de genes/proteínas que están relacionados con la defensa ante condiciones de estrés oxidativo en el tratamiento de CL. Sin embargo, existen dos genes/proteínas, Sc5dl (Sterol-C5-desaturase) y Rdh13 (Retinol dehydrogenase 13) que están relacionadas con la protección celular ante la oxidación y que se encuentran con bajos niveles de expresión ( $\log_2FC$ , -3.49 y -1.65) en el tratamiento de CL (Tabla 17).

Con relación a los genes/proteínas del sistema inmune se encuentran niveles altos de expresión en el tratamiento de CL, de la proteína Prss57 (Protease serine 57) que es activada dentro de las células del sistema inmune (neutrófilos), para después ser liberada al ambiente pericelular y atacar microbios patógenos ( $\log_2FC$ , 1.37). La proteína Fcgbp (Fragment crystallizable of Inmunoglobulin G binding protein) que está involucrada en la



formación de mucosa epitelial contra patógenos (log2FC, 1.50); así como la Gimap4 (GTPase, Immune associated protein family member 4) que mantiene la producción de Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) y la proliferación de linfocitos (log2FC, 1.27); esto sugiere que existen actores de la respuesta inmune innata que se encuentran activos en el tratamiento de luz continua (Tabla 17).

Por último el gen/proteína Natt-3 (Natterin-3) se encuentra sobreexpresada en el tratamiento de CL con un log2FC de 1.40. Natt-3 es una proteína tóxica aislada de la glándula de veneno de peces escorpión, esta proteína produce procesos inflamatorios al activar el sistema inmune, induce vasodilatación, permeabilidad vascular y estimula las terminaciones nerviosas de dolor. Sin embargo, es altamente probable que en *C. estor* cumpla funciones biológicas distintas a las descritas en el pez escorpión (Tabla 17). Para una referencia más amplia en la Tabla 17 se incluye un resumen de las principales funciones conocidas (según base de datos String-Genecards-Pubmed-Uniprot), así como los valores de log2FC que indican el cambio en los niveles de expresión de los genes/proteínas diferencialmente expresadas en *C. estor*.

**Tabla 17.** Resumen de principales funciones conocidas de los genes/proteínas diferencialmente expresados en el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*.

No	ID	log2FC	Descripción
1	Abca4	-3.00	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 4; In the visual cycle, acts as an inward-directed retinoid flippase, retinoid substrates imported by ABCA4 from the extracellular or intradiscal (rod) membrane surfaces to the cytoplasmic membrane surface are all-trans-retinaldehyde (ATR) and N-retinyl-phosphatidyl-ethanolamine (NR-PE). Once transported to the cytoplasmic surface, ATR is reduced to vitamin A by trans-retinoid dehydrogenase (tRDH) and then transferred to the retinal pigment epithelium (RPE) where it is converted to 11-cis-retinal. May play a role in photoreponse (2273 aa)
2	Abhd8	-2.66	Abhydrolase domain containing 8. This gene is upstream of, and in a head-to-head orientation with the gene for the mitochondrial ribosomal protein L34. The predicted protein contains alpha/beta hydrolase fold and secretory lipase domains (439 aa)
3	Adcy8	-2.58	Adenylate cyclase 8 (brain); This is a membrane-bound, calcium-stimulable adenyllyl cyclase. May be involved in learning, in memory and in drug dependence (By similarity) (1251 aa)
4	Ahctf1	-3.90	AT hook containing transcription factor 1; Required for the assembly of a functional nuclear pore complex (NPC) on the surface of chromosomes as nuclei form at the end of mitosis. May initiate NPC assembly by binding to chromatin and recruiting the Nup107-160 subcomplex of the NPC. Required for the localization of the Nup107-160 subcomplex of the NPC to the kinetochore during mitosis and for the completion of cytokinesis (2275 aa)
5	Amph	-1.69	Amphiphysin; May participate in mechanisms of regulated exocytosis in synapses and certain endocrine cell types. May control the properties of the membrane associated cytoskeleton (695 aa)
6	Ank1	-1.68	Ankyrin 1, erythrocytic; Attaches integral membrane proteins to cytoskeletal elements; binds to the erythrocyte membrane protein band 4.2, to Na-K ATPase, to the lymphocyte membrane protein GP85, and to the cytoskeletal proteins fodrin, tubulin, vimentin and desmin. Erythrocyte ankyrins also link spectrin (beta chain) to the cytoplasmic domain of the erythrocytes anion exchange protein; retain most or all of these binding functions (1897 aa)
7	Ankrd33	-1.63	Ankyrin repeat domain 33 . Specifically expressed in retinal photoreceptors and the pineal gland, transactivation analysis suggested that ankrd33 is a transcriptional cofactor that suppresses CRX-activated photoreceptor genes(452 aa)
8	Ankrd9	1.35	Ankyrin repeat domain 9, ANKRD9 mRNA level is reduced in response to apoptosis (317 aa)
9	Ano1	-1.80	Anoctamin 1, calcium activated chloride channel; Calcium-activated chloride channel (CaCC) which plays a role in transepithelial anion transport and smooth muscle contraction. Required for the normal functioning of the interstitial cells of Cajal (ICCs) which generate electrical pacemaker activity in gastrointestinal smooth muscles. Acts as a major contributor to basal and stimulated chloride conductance in airway epithelial cells and plays an important role in tracheal cartilage development (986 aa)
10	Ano2	-3.89	Anoctamin 2, Calcium-activated chloride channel (CaCC) which may play a role in olfactory signal transduction. Odorant molecules bind to odor-sensing receptors (OSRs), leading to an increase in calcium entry that activates CaCC current which amplifies the depolarization of the OSR cells, ANO2 seems to be the underlying chloride channel involved in this process. May mediate light perception amplification in retina (998 aa)
11	Apoa4	-3.42	Apolipoprotein A-IV; May have a role in chylomicrons and VLDL secretion and catabolism. Required for efficient activation of lipoprotein lipase by ApoC-II; potent activator of LCAT. ApoA-IV is a major component of HDL and chylomicrons (396 aa)
12	Aqp3	1.74	Aquaporin 3 (Gill blood group); Water channel required to promote glycerol permeability and water transport across cell membranes. Acts as a glycerol transporter in skin and plays an important role in regulating SC (stratum corneum) and epidermal glycerol content. Involved in skin hydration, wound healing, and tumorigenesis. Provides kidney medullary collecting duct with high permeability to water, thereby permitting water to move in the direction of an osmotic gradient. AQP3 is required for Nox-derived H2O2 signaling upon growth factor stimulation (292 aa)
13	Arl13b	-3.29	ADP-ribosylation factor-like 13B; Cilium-specific protein required to control the microtubule-based, ciliary axoneme structure. May act by maintaining the association between IFT subcomplexes A and B. Binds GTP but is not able to hydrolyze it; the GTPase activity remains unclear. Required to pattern the neural tube. Involved in cerebral cortex development- required for the initial formation of a polarized radial glial scaffold, the first step in the construction of the cerebral cortex, by regulating ciliary signaling. Regulates the migration and placement of postmitotic interneurons (428 aa)
14	Arl6	-1.46	ADP-ribosylation factor-like 6; Involved in membrane protein trafficking at the base of the ciliary organelle. Mediates recruitment onto plasma membrane of the BBSome complex which would constitute a coat complex required for sorting of specific membrane proteins to the primary cilia (PubMed-20603001). Together with BBS1, is necessary for correct trafficking of PKD1 to primary cilia (By similarity). Together with the BBSome complex and LTZL1, controls SMO ciliary trafficking and contributes to the sonic hedgehog (SHH) pathway regulation (PubMed-22072986). May regulate cilia assembly (186 aa)
15	Atcay	-1.23	Ataxia, cerebellar, Cayman type; Functions in the development of neural tissues, particularly the postnatal maturation of the cerebellar cortex. May play a role in neurotransmission through regulation of glutaminase/GLS, an enzyme responsible for the production in neurons of the glutamate neurotransmitter. Alternatively, may regulate the localization of mitochondria within axons and dendrites (371 aa)
16	Cacna2d1	-3.69	Calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 1; The alpha-2/delta subunit of voltage-dependent calcium channels regulates calcium current density and activation/inactivation kinetics of the calcium channel. Plays an important role in excitation-contraction coupling (By similarity) (1091 aa)
17	Camk1d	-2.22	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase ID; Calcium/calmodulin-dependent protein kinase that operates in the calcium-triggered CaMKK-CaMK1 signaling cascade and, upon calcium influx, activates CREB-dependent gene transcription, regulates calcium-mediated granulocyte function and respiratory burst and promotes basal dendritic growth of hippocampal neurons. In neutrophil cells, required for cytokine- induced proliferative responses and activation of the respiratory burst. Activates the transcription factor CREB1 in hippocampal neuron nuclei. May play a role in apoptosis of erythroleu (385 aa)
18	Cd38	-5.39	CD38 molecule; Synthesizes the second messengers cyclic ADP-ribose and nicotinate-adenine dinucleotide phosphate, the former a second messenger for glucose-induced insulin secretion. Also has cADPr hydrolase activity. Moonlights as a receptor in cells of the immune system (300 aa)
19	Cdhr1	-6.14	Cadherin-related family member 1; Potential calcium-dependent cell-adhesion protein. May be required for the structural integrity of the outer segment (OS) of photoreceptor cells (By similarity) (859 aa)



Resumen de funciones conocidas de los genes/proteínas diferencialmente expresados en el pez blanco de Pátzcuaro <i>C. estor</i>			
No	ID	log2FC	Descripción
20	Cdhr5	-6.64	Cadherin-related family member 5; Intermicrovillar adhesion molecule that forms, via its extracellular domain, calcium-dependent heterophilic complexes with CDHR2 on adjacent microvilli. Thereby, controls the packing of microvilli at the apical membrane of epithelial cells. Through its cytoplasmic domain, interacts with microvillus cytoplasmic proteins to form the intermicrovillar adhesion complex/IMAC. This complex plays a central role in microvilli and epithelial brush border differentiation (845 aa)
21	Cdr2	-1.84	Cerebellar degeneration-related protein 2, Diseases associated with CDR2 include Cerebellar Degeneration and Paraneoplastic Cerebellar Degeneration. An important paralog of this gene is CDR2L. 62kDa (454 aa)
22	Cep290	-2.60	Centrosomal protein 290kDa; Part of the tectonic-like complex which is required for tissue-specific ciliogenesis and may regulate ciliary membrane composition (By similarity). Activates ATF4-mediated transcription. Required for the correct localization of ciliary and phototransduction proteins in retinal photoreceptor cells; may play a role in ciliary transport processes (2479 aa)
23	Cngb1	-1.74	Cyclic nucleotide-gated channel beta 1; Subunit of cyclic nucleotide-gated (CNG) channels, nonselective cation channels, which play important roles in both visual and olfactory signal transduction. When associated with CNGA1, it is involved in the regulation of ion flow into the rod photoreceptor outer segment (ROS), in response to light-induced alteration of the levels of intracellular cGMP (1251 aa)
24	Cobll1	-2.40	COBL-like 1, Plays an important role in the reorganization of the actin cytoskeleton. Regulates neuron morphogenesis and increases branching of axons and dendrites. Regulates dendrite branching in Purkinje cells (By similarity). Binds to and sequesters actin monomers (G actin). Nucleates actin polymerization by assembling three actin monomers in cross-filament orientation and thereby promotes growth of actin filaments at the barbed end. Can also mediate actin depolymerization at barbed ends and severing of actin filaments. Promotes formation of cell ruffles (1166 aa)
25	Col2a1	2.95	Collagen, type II, alpha 1; Type II collagen is specific for cartilaginous tissues. It is essential for the normal embryonic development of the skeleton, for linear growth and for the ability of cartilage to resist compressive forces (1487 aa)
26	Cplx3	-1.86	Complexin 3; Positively regulates a late step in synaptic vesicle exocytosis (158 aa)
27	Crtac1	-4.67	Cartilage acidic protein 1, This gene encodes a glycosylated extracellular matrix protein that is found in the interterritorial matrix of articular deep zone cartilage. This protein is used as a marker to distinguish chondrocytes from osteoblasts and mesenchymal stem cells in culture. The presence of FG-GAP motifs and an RGD integrin-binding motif suggests that this protein may be involved in cell-cell or cell-matrix interactions. Copy number alterations in this gene have been observed in neurofibromatosis type 1-associated glomus tumors. Alternative splicing results in multiple transcript variants (661 aa)
28	Cs	-10.86	Citrate synthase, The protein encoded by this gene is a Krebs tricarboxylic acid cycle enzyme that catalyzes the synthesis of citrate from oxaloacetate and acetyl coenzyme A. The enzyme is found in nearly all cells capable of oxidative metabolism. This protein is nuclear encoded and transported into the mitochondrial matrix, where the mature form is found. (466 aa)
29	Ctgf	1.19	Connective tissue growth factor; Major connective tissue mitogen secreted by vascular endothelial cells. Promotes proliferation and differentiation of chondrocytes. Mediates heparin- and divalent cation-dependent cell adhesion in many cell types including fibroblasts, myofibroblasts, endothelial and epithelial cells. Enhances fibroblast growth factor-induced DNA synthesis (349 aa)
30	Cyp2k	1.85	Cytochrome P450 2k; Hepatic drug metabolism, Spawning, sexual maturation in turbot males, restore of lipid peroxides by metabolising endogenous compounds such as medium to long-chain fatty acids, aromatase activity, binding to heme groups, monooxygenase and oxidoreductase activity in membrane of endoplasmic reticulum (505 aa)
31	Egfr	1.25	Epidermal growth factor receptor; Receptor tyrosine kinase binding ligands of the EGF family and activating several signaling cascades to convert extracellular cues into appropriate cellular responses. Known ligands include EGF, TGFA/TGF-alpha, amphiregulin, epigen/EPGN, BTC/betacellulin, epiregulin/EREG and HBEGF/heparin-binding EGF. Ligand binding triggers receptor homo- and/or heterodimerization and autophosphorylation on key cytoplasmic residues. The phosphorylated receptor recruits adapter proteins like GRB2 which in turn activates complex downstream signaling cascades. (1210 aa)
32	Esrrg	-3.33	Estrogen-related receptor gamma; Orphan receptor that acts as transcription activator in the absence of bound ligand. Binds specifically to an estrogen response element and activates reporter genes controlled by estrogen response elements (By similarity). Induces the expression of PERM1 in the skeletal muscle (458 aa)
33	Faim2	-1.99	Fas apoptotic inhibitory molecule 2; Antiapoptotic protein which protects cells uniquely from Fas-induced apoptosis. Regulates Fas-mediated apoptosis in neurons by interfering with caspase-8 activation. May play a role in cerebellar development by affecting cerebellar size, internal granular layer (IGL) thickness, and Purkinje cell (PC) development (316 aa)
34	Fam161a	-4.22	Family with sequence similarity 161, member A, It is expressed mainly in the retina. Mouse studies suggested that this gene is involved in development of retinal progenitors during embryogenesis, and that its activity is restricted to mature photoreceptors after birth. Mutations in this gene cause autosomal recessive retinitis pigmentosa-28. (716 aa)
35	Fcgbp	1.50	Fc fragment of IgG binding protein; May be involved in the maintenance of the mucosal structure as a gel-like component of the mucosa (5405 aa)
36	Fmn1	-1.27	Formin 1; Plays a role in the formation of adherens junction and the polymerization of linear actin cables (1196 aa)
37	Gimap4	1.27	GTPase, IMAP family member 4; May play a role in regulating lymphocyte apoptosis (By similarity). Exhibits intrinsic GTPase activity. Shows a higher affinity for GDP over GTP (about 12-fold higher), and binding shows an absolute requirement for magnesium; decrease in IFN-gamma secretion and increase apoptosis in response to GIMAP4 downregulation (329 aa)
38	Gimap5	-7.24	GTPase, IMAP family member 5; Required for mitochondrial integrity and T-cell survival. May contribute to T-cell quiescence (By similarity) (307 aa)
39	Gpr98	-2.15	G protein-coupled receptor 98; Receptor that may have an important role in the development of the central nervous system (6306 aa)
40	Grin2a	-2.47	Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2A; NMDA receptor subtype of glutamate-gated ion channels possesses high calcium permeability and voltage-dependent sensitivity to magnesium. Activation requires binding of agonist to both types of subunits (1464 aa)
41	Guca1a	-2.12	Guanylate cyclase activator 1A (retina); Stimulates retinal guanylyl cyclase when free calcium ions concentration is low and inhibits guanylyl cyclase when free calcium ions concentration is elevated (PubMed:19459154). This Ca(2+)-sensitive regulation of retinal guanylyl cyclase is a key event in recovery of the dark state of rod photoreceptors following light exposure (201 aa)
42	Gucy2f	-2.58	Guanylate cyclase 2F, retinal; Probably plays a specific functional role in the rods and/or cones of photoreceptors. It may be the enzyme involved in the resynthesis of cGMP required for recovery of the dark state after phototransduction (1108 aa)
43	Hgs	3.09	Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate; Involved in intracellular signal transduction mediated by cytokines and growth factors. When associated with STAM, it suppresses DNA signaling upon stimulation by IL-2 and GM-CSF. Could be a direct effector of PI3-kinase in vesicular pathway via early endosomes and may regulate trafficking to early and late endosomes by recruiting clathrin. May concentrate ubiquitinated receptors within clathrin-coated regions. Involved in down-regulation of receptor tyrosine kinase via multivesicular body (MVBs) when complexed with STAM (777 aa)
44	Hist1h1b	1.28	Histone cluster 1, H1b; Histone H1 protein binds to linker DNA between nucleosomes forming the macromolecular structure known as the chromatin fiber. Histones H1 are necessary for the condensation of nucleosome chains into higher-order structured fibers. Acts also as a regulator of individual gene transcription through chromatin remodeling, nucleosome spacing and H3K9 DNA methylation, may activate sirt1 in response to oxidative stress and promote cell growth (By similarity) (226 aa)
45	Kcna1	-2.10	Potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member 1. Plays a key role in controlling excitability in a number of systems, such as regulation of the contraction of smooth muscle, the tuning of hair cells in the cochlea, regulation of transmitter release, and innate immunity. (1219 aa)
46	Kif25	-2.51	Kinesin family member 25; Negative regulator of amino acid starvation-induced autophagy (384 aa)
47	Klf5	1.33	Kruppel-like factor 5 (intestinal); Transcription factor that binds to GC box promoter elements. Activates the transcription of these genes, It may participate in both promoting and suppressing cell proliferation (457 aa)
48	L1td1	-3.16	LINE-1 type transposase domain containing 1, pluripotent protein markers for undifferentiated PSCs, inhibiting cell proliferation and inducing apoptosis. (865 aa)
49	Lactb2	1.64	Lactamase, beta 2 Endoribonuclease; cleaves preferentially 3 to purine-pyrimidine dinucleotide motifs in single-stranded RNA. The cleavage product contains a free 3'-OH group. Has no activity with double-stranded RNA or DNA. Required for normal mitochondrial function and cell viability (288 aa)
50	Lactb1	-2.67	Lactamase, beta-like 1 This gene encodes a mitochondrially-localized protein that has sequence similarity to prokaryotic beta-lactamases. Many of the residues responsible for beta-lactamase activity are not conserved in this protein, suggesting it may have a different enzymatic function. Increased expression of the related mouse gene was found to be associated with obesity. Alternative splicing results in multiple transcript variants encoding different protein isoforms (546 aa)
51	Lamb3	2.12	Laminin, beta 3; Binding to cells via a high affinity receptor, laminin is thought to mediate the attachment, migration and organization of cells into tissues during embryonic development by interacting with other extracellular matrix components (1172 aa)
52	Lbh	-1.86	Limb bud and heart development homolog (mouse); Transcriptional activator which may act in mitogen-activated protein kinase signaling pathway (105 aa)
53	Lrit1	-1.48	Leucine-rich repeat, immunoglobulin-like and transmembrane domains 1; Possible role in phototransduction (623 aa)
54	Lrit3	-4.42	Leucine-rich repeat, immunoglobulin-like and transmembrane domains 3; Might facilitate FGFR1 exit from the endoplasmic reticulum to the Golgi. Could be a regulator of the FGFRs (634 aa)
55	Lyz	-3.67	Lysozyme; Lysozymes have primarily a bacteriolytic function; those in tissues and body fluids are associated with the monocyte-macrophage system and enhance the activity of immunogens (148 aa)
56	March1	-2.15	Membrane-associated ring finger (C3HC4) 1, E3 ubiquitin-protein ligase; E3 ubiquitin-protein ligase that mediates ubiquitination of TFRC, CD86, FAS and MHC class II proteins, such as HLA-DR alpha and beta, and promotes their subsequent endocytosis and sorting to lysosomes via multivesicular bodies. By constitutively ubiquitinating MHC class II proteins in immature dendritic cells, down-regulates their cell surface localization thus sequestering them in the intracellular endosomal system (289 aa)



No	ID	log2FC	Descripción
57	Muc2	-1.78	Mucin 2, oligomeric mucus/gel-forming; Coats the epithelia of the intestines, airways, and other mucus membrane-containing organs. Thought to provide a protective, lubricating barrier against particles and infectious agents at mucosal surfaces. Major constituent of both the inner and outer mucus layers of the colon and may play a role in excluding bacteria from the inner mucus layer (2817 aa)
58	Myh3	-1.32	Myosin, heavy chain 3, skeletal muscle, embryonic; Muscle contraction (1940 aa)
59	Myo7a	-5.11	Myosin VIIA; Myosins are actin-based motor molecules with ATPase activity. Unconventional myosins serve in intracellular movements. Their highly divergent tails bind to membranous compartments, which are then moved relative to actin filaments. In the retina, plays an important role in the renewal of the outer photoreceptor disks. Plays an important role in the distribution and migration of retinal pigment epithelial (RPE) melanosomes and phagosomes, and in the regulation of opsin transport in retinal photoreceptors. In the inner ear, plays an important role in differentiation (2215 aa)
60	Natt3	1.40	Natterin-3; Kininogenase (hidrolase) activity, involved in inflammatory processes probably by TLR4/MyD88/PI3K pathway, induce vasodilation, vascular permeability and stimulate the nerve terminals involved in pain (364 aa)
61	Ndufaf3	-1.26	NADH dehydrogenase (ubiquinone) complex I, assembly factor 3; Essential factor for the assembly of mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase complex (complex I) (184 aa)
62	Opn1sw	-1.89	Opsin 1 (cone pigments), short-wave-sensitive; Visual pigments are the light-absorbing molecules that mediate vision. They consist of an apoprotein, opsin, covalently linked to cis-retinal (348 aa)
63	Osbpl7	-4.09	Oxysterol binding protein-like 7, involved in lipid homeostasis affected in alzheimer patients and overregulated in cancer and tumors (842 aa)
64	Pcbp3	-3.82	poly(rC) binding protein 3; Single-stranded nucleic acid binding protein that binds preferentially to oligo dC, play important roles in post-transcriptional activities and have different cellular distributions. (371 aa)
65	Pcbp4	-1.42	poly(rC) binding protein 4; Single-stranded nucleic acid binding protein that binds preferentially to oligo dC. This gene is induced by the p53 tumor suppressor, and the encoded protein can suppress cell proliferation by inducing apoptosis and cell cycle arrest in G(2)-M (403 aa)
66	Pclo	-3.25	Piccolo (presynaptic cytomatrix protein); May act as a scaffolding protein involved in the organization of synaptic active zones and in synaptic vesicle trafficking (5142 aa)
67	Pde5a	-2.04	Phosphodiesterase 5A, cGMP-specific; Plays a role in signal transduction by regulating the intracellular concentration of cyclic nucleotides. This phosphodiesterase catalyzes the specific hydrolysis of cGMP to 5'-GMP (PubMed-9714779, PubMed-15489334). Specifically regulates nitric-oxide-generated cGMP (PubMed-15489334) (875 aa)
68	Pde6a	-1.36	Phosphodiesterase 6A, cGMP-specific, rod, alpha; This protein participates in processes of transmission and amplification of the visual signal (860 aa)
69	Pde6b	-2.16	Phosphodiesterase 6B, cGMP-specific, rod, beta; This protein participates in processes of transmission and amplification of the visual signal. Necessary for the formation of a functional phosphodiesterase holoenzyme (854 aa)
70	Pde6c	-3.44	Phosphodiesterase 6C, cGMP-specific, cone, alpha prime. Mutations in this gene are associated with cone dystrophy type 4 (COD4) (858 aa)
71	Pdk2	1.13	Pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 2; Kinase that plays a key role in the regulation of glucose and fatty acid metabolism and homeostasis via phosphorylation of the pyruvate dehydrogenase subunits PDHA1 and PDHA2. This inhibits pyruvate dehydrogenase activity, and thereby regulates metabolite flux through the tricarboxylic acid cycle, down-regulates aerobic respiration and inhibits the formation of acetyl-coenzyme A from pyruvate. Inhibition of pyruvate dehydrogenase decreases glucose utilization and increases fat metabolism. Mediates cellular responses to insulin. (407 aa)
72	Pip5k1a	-2.22	Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, alpha; Catalyzes the phosphorylation of phosphatidylinositol 4-phosphate (PtdIns4P) to form phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P2). PtdIns(4,5)P2 is involved in a variety of cellular processes and is the substrate to form phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PtdIns(3,4,5)P3), another second messenger. The majority of PtdIns(4,5)P2 is thought to occur via type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinases given the abundance of PtdIns4P. Participates in a variety of cellular processes such as actin cytoskeleton (562 aa)
73	Ptch2	-2.21	Phospholipase C, eta 2; The production of the second messenger molecules diacylglycerol (DAG) and inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) is mediated by activated phosphatidylinositol-specific phospholipase C enzymes. This phospholipase activity is very sensitive to calcium. May be important for formation and maintenance of the neuronal network in the postnatal brain (By similarity) (1416 aa)
74	Plekhd1	-2.83	Pleckstrin homology domain containing, family D (with coiled-coil domains) member 1, Diseases associated with PLEKHD1 include Atrial Heart Septal Defect. (506 aa)
75	Ppp1r9a	-1.22	Protein phosphatase 1, regulatory subunit 9A; Binds to actin filaments (F-actin) and shows cross-linking activity. Binds along the sides of the F-actin. May be involved in neurite formation. Inhibits protein phosphatase 1- $\alpha$ activity (By similarity) (1374 aa)
76	Prom1	-2.53	Prominin 1; May play a role in cell differentiation, proliferation and apoptosis (PubMed-24556617). Binds cholesterol in cholesterol-containing plasma membrane microdomains and may play a role in the organization of the apical plasma membrane in epithelial cells. During early retinal development acts as a key regulator of disk morphogenesis. Involved in regulation of MAPK and Akt signaling pathways. In neuroblastoma cells suppresses cell differentiation such as neurite outgrowth in a RET-dependent manner (PubMed-20818439) (865 aa)
77	Prph2	-2.80	Peripherin 2 (retinal degeneration, slow); May function as an adhesion molecule involved in stabilization and compaction of outer segment disks or in the maintenance of the curvature of the rim. It is essential for disk morphogenesis (346 aa)
78	Prss57	1.37	Protease, serine, 57; The encoded protein may undergo proteolytic activation before storage in azurophilic granules, in neutrophil cells of the immune system. Following neutrophil activation, the protease is released into the pericellular environment, where it may play a role in defense against microbial pathogens (283 aa)
79	Rd3	-2.05	Retinal degeneration 3, expressed in rod and cone photoreceptor cells, RD3 interacts with guanylate cyclases GC1 and GC2 in retinal cell extracts, are responsible for early onset photoreceptor degeneration in Leber Congenital Amaurosis 12 patients, the rd3 mice, and the rcd2 collies (195 aa)
80	Rdh13	-1.65	Retinol dehydrogenase 13 (all-trans-9-cis); Does not exhibit retinol dehydrogenase (RDH) activity in vitro. This gene encodes a mitochondrial short-chain dehydrogenase/reductase, which catalyzes the reduction and oxidation of retinoids. The encoded enzyme may function in retinoic acid production and may also protect the mitochondria against oxidative stress. (331 aa)
81	Rgs9	-1.38	Regulator of G-protein signaling 9; Inhibits signal transduction by increasing the GTPase activity of G protein alpha subunits thereby driving them into their inactive GDP-bound form. Binds to G(t)-alpha. Involved in phototransduction; key element in the recovery phase of visual transduction (By similarity) (674 aa)
82	Rorb	-1.51	RAR-related orphan receptor B; Nuclear receptor that binds DNA as a monomer to ROR response elements (RORE) containing a single core motif half-site 5'-AGGTCA-3' preceded by a short A-T-rich sequence. Considered to have intrinsic transcriptional activity, have some natural ligands such as all-trans retinoic acid (ATRA) and other retinoids which act as inverse agonists repressing the transcriptional activity. Required for normal postnatal development of rod and cone photoreceptor cells. Modulates rod photoreceptors differentiation (459 aa)
83	Samd7	-2.50	Sterile alpha motif domain containing 7, is essential for silencing nonrod gene expression through H3K27me3 regulation in rod photoreceptor cells. Samd7 deficiency causes the derepression of nonrod gene expression in rod photoreceptor cells. Samd7 is a cell type-specific PRC1 component epigenetically defining rod photoreceptor cell identity. (446 aa)
84	Sc5dl	-3.49	sterol-C5-desaturase (ERG3 delta-5-desaturase homolog, S. cerevisiae)-like; Catalyzes a dehydrogenation to introduce C5-6 double bond into lathosterol. Impaired SC5D activity leads to a similar deficiency of cholesterol but an accumulation of lathosterol, protein expression related to mevalonate metabolism, apoptosis, glycolysis, oxidative stress, protein biosynthesis, intracellular trafficking, and cytoskeleton due to decreased cholesterol or a toxic effect of sterol precursors (299 aa)
85	Scn2a	-2.95	Sodium channel, voltage-gated, type II, alpha subunit; Mediates the voltage-dependent sodium ion permeability of excitable membranes. Assuming opened or closed conformations in response to the voltage difference across the membrane, the protein forms a sodium-selective channel through which Na(+) ions may pass in accordance with their electrochemical gradient (2005 aa)
86	Scn4a	-4.23	Sodium channel, voltage-gated, type IV, alpha subunit; This protein mediates the voltage-dependent sodium ion permeability of excitable membranes. Assuming opened or closed conformations in response to the voltage difference across the membrane, the protein forms a sodium-selective channel through which Na(+) ions may pass in accordance with their electrochemical gradient. This sodium channel may be present in both denervated and innervated skeletal muscle (1836 aa)
87	Serinc1	-2.74	Serine incorporator 1; Enhances the incorporation of serine into phosphatidylserine and sphingolipids, Serinc1 is dispensable for certain immune cell functions and does not contribute to links between lipid composition in immune cells and autoimmunity. (453 aa)
88	Serinc4	-3.14	Serine incorporator 4; Incorporates a polar amino acid serine into membranes and facilitates the synthesis of two serine-derived lipids, phosphatidylserine and sphingolipids, possible role in linking neural activity and lipid biosynthesis (518 aa)
89	Sgk1	-1.37	Serum/glucocorticoid induced kinase 1; Serine/threonine-protein kinase which is involved in the regulation of a wide variety of ion channels, membrane transporters, cellular enzymes, transcription factors, neuronal excitability, cell growth, proliferation, survival, migration and apoptosis. Plays an important role in cellular stress response. Contributes to regulation of renal Na(+) retention, renal K(+) elimination, salt appetite, gastric acid secretion, intestinal Na(+)/H(+) exchange and nutrient transport, insulin-dependent salt sensitivity of blood pressure (526 aa)
90	Slc17a7	-2.05	Solute carrier family 17 (sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter), member 7; Mediates the uptake of glutamate into synaptic vesicles at presynaptic nerve terminals of excitatory neural cells. May also mediate the transport of inorganic phosphate (560 aa)
91	Slc1a7	-2.96	Solute carrier family 1 (glutamate transporter), member 7; Transports L-glutamate; the L-glutamate uptake is sodium- and voltage-dependent and chloride-independent. Its associated chloride conductance may participate in visual processing (560 aa)
92	Slc22a13	-3.52	Solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 13, transmembrane protein involved in the transport of small molecules. This protein can function to mediate urate uptake and is a high affinity nicotinate exchanger in the kidneys and the intestine (551 aa)



No	ID	log2FC	Descripción
93	Slc24a1	-1.25	Solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 1; Critical component of the visual transduction cascade, controlling the calcium concentration of outer segments during light and darkness. Light causes a rapid lowering of cytosolic free calcium in the outer segment of both retinal rod and cone photoreceptors and the light-induced lowering of calcium is caused by extrusion via this protein which plays a key role in the process of light adaptation. Transports 1 Ca(2+) and 1 K(+) in exchange for 4 Na+(1099 aa)
94	Slc24a2	-3.53	Solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 2; Critical component of the visual transduction cascade, controlling the calcium concentration of outer segments during light and darkness. Light causes a rapid lowering of cytosolic free calcium in the outer segment of both retinal rod and cone photoreceptors and the light-induced lowering of calcium is caused by extrusion via this protein which plays a key role in the process of light adaptation. Transports 1 Ca(2+) and 1 K(+) in exchange for 4 Na+(661 aa)
95	Slc34a1	-3.86	Solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 1; May be involved in actively transporting phosphate into cells via Na(+) cotransport in the renal brush border membrane. Probably mediates 70-80% of the apical influx. Plays a role in the development of human prostate cancer, from prostatic intraepithelial neoplasia to invasive prostate cancer. (639 aa)
96	Slc43a2	1.73	Solute carrier family 43, member 2; Sodium-, chloride-, and pH-independent high affinity transport of large neutral amino acids. This protein may contribute to the transfer of amino acids across the placental membrane to the fetus, may participate in cell growth and proliferation by activation of mTOR complex1 (569 aa)
97	Slc6a1	-4.15	Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, GABA), member 1; Terminates the action of GABA by its high affinity sodium-dependent reuptake into presynaptic terminals (599 aa)
98	Sparcl1	2.66	SPARC-like 1 (hevin) or Proliferation-Inducing Protein 33, It is implicated in the regulation of cell adhesion, migration, and proliferation, SPARCL1-containing sensory pathway in the ganglion and brainstem of the spinal and trigeminal nervous system, play different roles in tumor biology, as both oncogene and tumor suppressor, based on tumor type (664 aa)
99	Srrm3	-1.69	Serine/arginine repetitive matrix 3, processing of REST-003 into ncRNAs is controlled by an uncharacterized serine/arginine repeat-related protein, SRRM3. SRRM3 expression may be under REST-mediated transcriptional control, as it increases following REST downregulation. (653 aa)
100	Stra6	-2.75	Stimulated by retinoic acid 6 homolog (mouse); May act as a high-affinity cell-surface receptor for the complex retinol-retinol binding protein (RBP/RBP4). Acts by removing retinol from RBP/RBP4 and transports it across the plasma membrane, where it can be metabolized. This mechanism does not depend on endocytosis. Binds to RBP/RBP4 with high affinity. Increases cellular retinol uptake from the retinol-RBP complex (By similarity) (706 aa)
101	Stx3	-2.66	Syntaxin 3; Potentially involved in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones (289 aa)
102	Sv2a	-1.63	Synaptic vesicle glycoprotein 2A; Plays a role in the control of regulated secretion in neural and endocrine cells, enhancing selectively low-frequency neurotransmission. Positively regulates vesicle fusion by maintaining the readily releasable pool of secretory vesicles (By similarity) (742 aa)
103	Sws2a/B	-2.13	Short-wavelength sensitive opsin 2A beta and short-wavelength sensitive opsin 2B genes, Putative blue sensitive visual pigment (320/350 aa)
104	Syt1	-2.15	Synaptotagmin I; May have a regulatory role in the membrane interactions during trafficking of synaptic vesicles at the active zone of the synapse. It binds acidic phospholipids with a specificity that requires the presence of both an acidic head group and a diacyl backbone. A Ca(2+)-dependent interaction between synaptotagmin and putative receptors for activated protein kinase C has also been reported. It can bind to at least three additional proteins in a Ca(2+)-independent manner; these are neuexins, syntaxin and AP2. Plays a role in dendrite formation by melanocytes (PubMed-23999003) (422 aa)
105	Syt2	-1.17	Synaptotagmin II; Exhibits calcium-dependent phospholipid and inositol polyphosphate binding properties (By similarity). May have a regulatory role in the membrane interactions during trafficking of synaptic vesicles at the active zone of the synapse (By similarity). Plays a role in dendrite formation by melanocytes (PubMed-23999003) (419 aa)
106	Syvn1	-2.42	Synovial apoptosis inhibitor 1, synoviolin; Acts as an E3 ubiquitin-protein ligase which accepts ubiquitin specifically from endoplasmic reticulum-associated UBC7 E2 ligase and transfers it to substrates, promoting their degradation. Component of the endoplasmic reticulum quality control (ERQC) system also called ER-associated degradation (ERAD) involved in ubiquitin-dependent degradation of misfolded endoplasmic reticulum proteins. Also promotes the degradation of normal but naturally short-lived proteins such as SGK. Protects cells from ER stress-induced apoptosis. (617 aa)
107	Tef	1.32	Thyrotrophic embryonic factor; Transcription factor that binds to and transactivates the TSHB promoter. Binds to a minimal DNA-binding sequence 5'-[TC][AG][AG]TTA[TC][AG]-3', may induce DNA repair and antiapoptotic processes, repress direct to lght, can induce RORB (circadian rhythm) expression by D-BOX activation (303 aa)
108	Tigd1	-3.25	Tigger transposable element derived 1, These proteins are related to DNA transposons found in fungi and nematodes, and more distantly to the Tc1 and mariner transposases. They are also very similar to the major mammalian centromere protein B, The exact function of this gene is not known. (591 aa)
109	Tmem132d	-4.34	Transmembrane protein 132D; May serve as a cell-surface marker for oligodendrocyte differentiation (1099 aa)
110	Tmem138	-2.95	Transmembrane protein 138; Required for ciliogenesis, Mutations in this gene are associated with the autosomal recessive neurodevelopmental disorder Joubert Syndrome (162 aa)
111	Tulp1	-2.22	Tubby like protein 1; Required for normal development of photoreceptor synapses. Required for normal photoreceptor function and for long-term survival of photoreceptor cells. Interacts with cytoskeleton proteins and may play a role in protein transport in photoreceptor cells (By similarity). Binds lipids, especially phosphatidylinositol 3-phosphate, phosphatidylinositol 4-phosphate, phosphatidylinositol 5-phosphate, phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, phosphatidylinositol 3,4,5-bisphosphate and phosphatidylserine (542 aa)
112	Ucp2	1.60	Uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier); UCP are mitochondrial transporter proteins that create proton leaks across the inner mitochondrial membrane, thus uncoupling oxidative phosphorylation from ATP synthesis. As a result, energy is dissipated in the form of heat (309 aa)
113	Unc13b	-2.52	Unc-13 homolog B (C. elegans); Plays a role in vesicle maturation during exocytosis as a target of the diacylglycerol second messenger pathway. Is involved in neurotransmitter release by acting in synaptic vesicle priming prior to vesicle fusion and participates in the activity- depending refilling of readily releasable vesicle pool (RRP). Essential for synaptic vesicle maturation in a subset of excitatory/glutamatergic but not inhibitory/GABA-mediated synapses (By similarity) (1591 aa)
114	Usp21	-1.28	Ubiquitin specific peptidase 21; Deubiquitinates histone H2A, a specific tag for epigenetic transcriptional repression, thereby acting as a coactivator. Deubiquitination of histone H2A releases the repression of di- and trimethylation of histone H3 at 'Lys-4', resulting in regulation of transcriptional initiation. Regulates gene expression via histone H2A deubiquitination (By similarity). Also capable of removing NEDD8 from NEDD8 conjugates but has no effect on Sentrin-1 conjugates (PubMed-10799498). Deubiquitinates BAZ2A/TIP5 leading to its stabilization (PubMed-26100909) (565 aa)
115	Wasf1	-1.69	WAS protein family, member 1; Downstream effector molecule involved in the transmission of signals from tyrosine kinase receptors and small GTPases to the actin cytoskeleton. Promotes formation of actin filaments. Part of the WAVE complex that regulates lamellipodia formation. The WAVE complex regulates actin filament reorganization via its interaction with the Arp2/3 complex (559 aa)

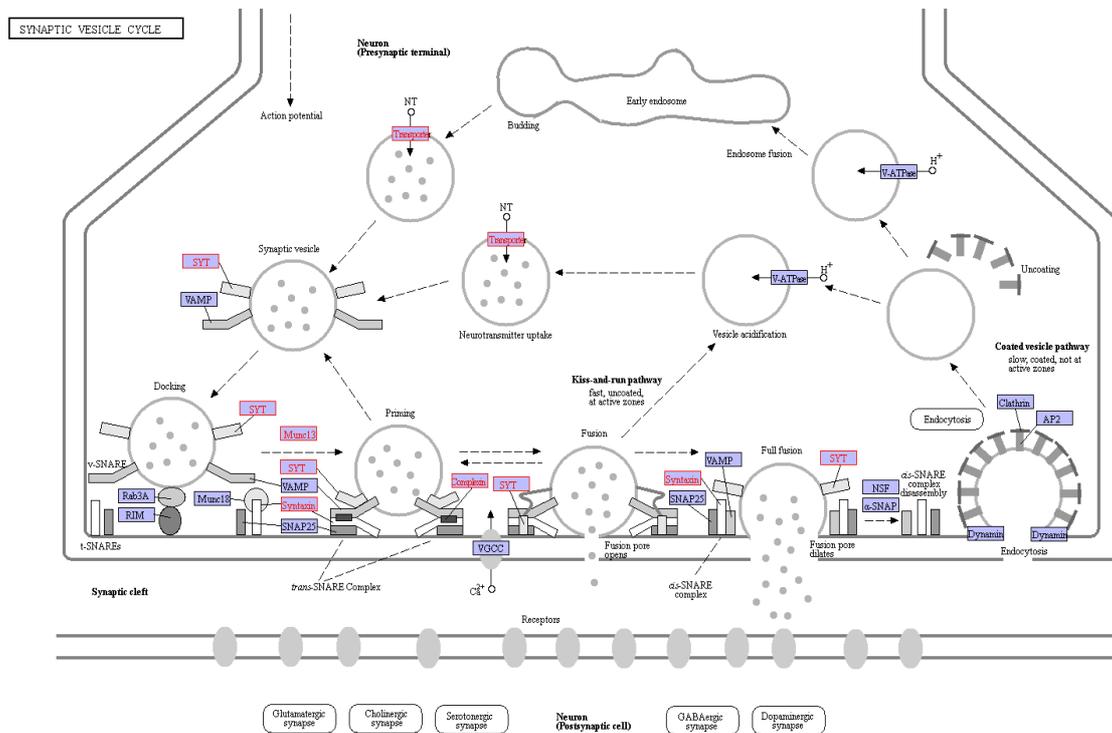
Según base de datos String-Genecards-Pubmed-Uniprot para *Homo sapiens*. ID (Identificador del gen de acuerdo a bases de datos internacionales); log2FC (Cambio del nivel de expresión en logaritmo en base 2 promediado de RSEM y eXpress), valores positivos indican alta expresión en el tratamiento de CL, valores negativos indican baja expresión en el tratamiento de CL. Las proteínas Cyp2k, Natt-3 y Sws2a/b son exclusivas de peces por lo que se consultó en las diferentes bases de datos para este tipo de organismos.

Es importante destacar que en la Tabla 17 existen genes/proteínas relacionadas con mecanismos epigenéticos (Hist1h1b, March1, Samd7, Srrm3 y Usp21). Con control de la transcripción (Ahctf1, Ankrd33, Cep290, Esrrg, Lbh, Klf5, Rorb, Sgk1 y Tef). Con procesos mitocondriales (Abhd8, Atcay, Cs, Gimap5, Lactb2, Ndufaf3, Rdh13 y Ucp2). Con procesos apoptóticos (L1td1 y Pcbp4). Con procesos antiapoptóticos (Ankrd9, Faim2, Gimap4, Kif25, Sgk1, Syvn1 y Tef) y otros que su función es poco conocida como Tigd1 (Tigger transposable element derived 1) Lactbl1 (Lactamase Beta Like 1) y Plekhd1

(Pleckstrin homology domain, family D member 1), por lo que algunos de estos genes/proteínas identificados podrían ser susceptibles de estudios posteriores en *C. estor*.

Por otro lado, los procesos biológicos de Kegg afectadas por el fotoperiodo, según el análisis de enriquecimiento estadístico (Tabla 16), son las del ciclo de vesículas sinápticas, metabolismo de purinas y fototransducción ( $FDR \leq 0.05$ ). Debido a la importancia estadística de los procesos afectados, se presentan a continuación las gráficas que describen en detalle la participación de los genes/proteínas en los procesos biológicos mencionados.

En la Figura 43, se observa la representación de la comunicación entre las neuronas, que es mediada por acción de las vesículas sinápticas (SVs) en el nervio terminal; en esta parte anatómica de la célula ocurre el ciclo de las SVs, que presentan episodios repetitivos de exocitosis y endocitosis para transportar los neurotransmisores de una neurona a otra.



**Figura 43.** Diagrama del ciclo de vesículas sinápticas regulado negativamente en condiciones de luz continua para el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*. Los nombres en color rojo muestran las genes/proteínas afectadas; Transporter (Slc17a6\_7\_8; MFS transporter); Munc13 (Unc13; protein unc-13); Syntaxin (Stx1b\_2\_3; syntaxin 1B/2/3); Complexin (Cplx3\_4; complexin-3/4); SYT (Sytx1; Synaptotagmin-1); Synaptic vesicle cycle ko 04721.

Una vez que las SVs se encuentran formadas se localizan en una región especializada de la membrana plasmática presináptica conocida como zona activa. Cuando ocurre el potencial de acción, el calcio  $Ca_2^+$  se introduce a través de canales activados por voltaje (VGCC) y provoca la liberación de los



neurotransmisores por excitación. Posterior a la fusión con la zona activa las SVs son recapturadas por endocitosis para iniciar un ciclo nuevamente. Los resultados indican que este proceso de sinápsis se encuentra suprimida en los organismos expuestos a las condiciones de luz continua ya que se afectan cinco proteínas Cplx3, Slc17a7, Stx3, Syt1 y Unc13, con valores  $\log_2FC$  de -1.86, -2.05, -2.15, -2.66, y -2.52 respectivamente (Tabla 17).

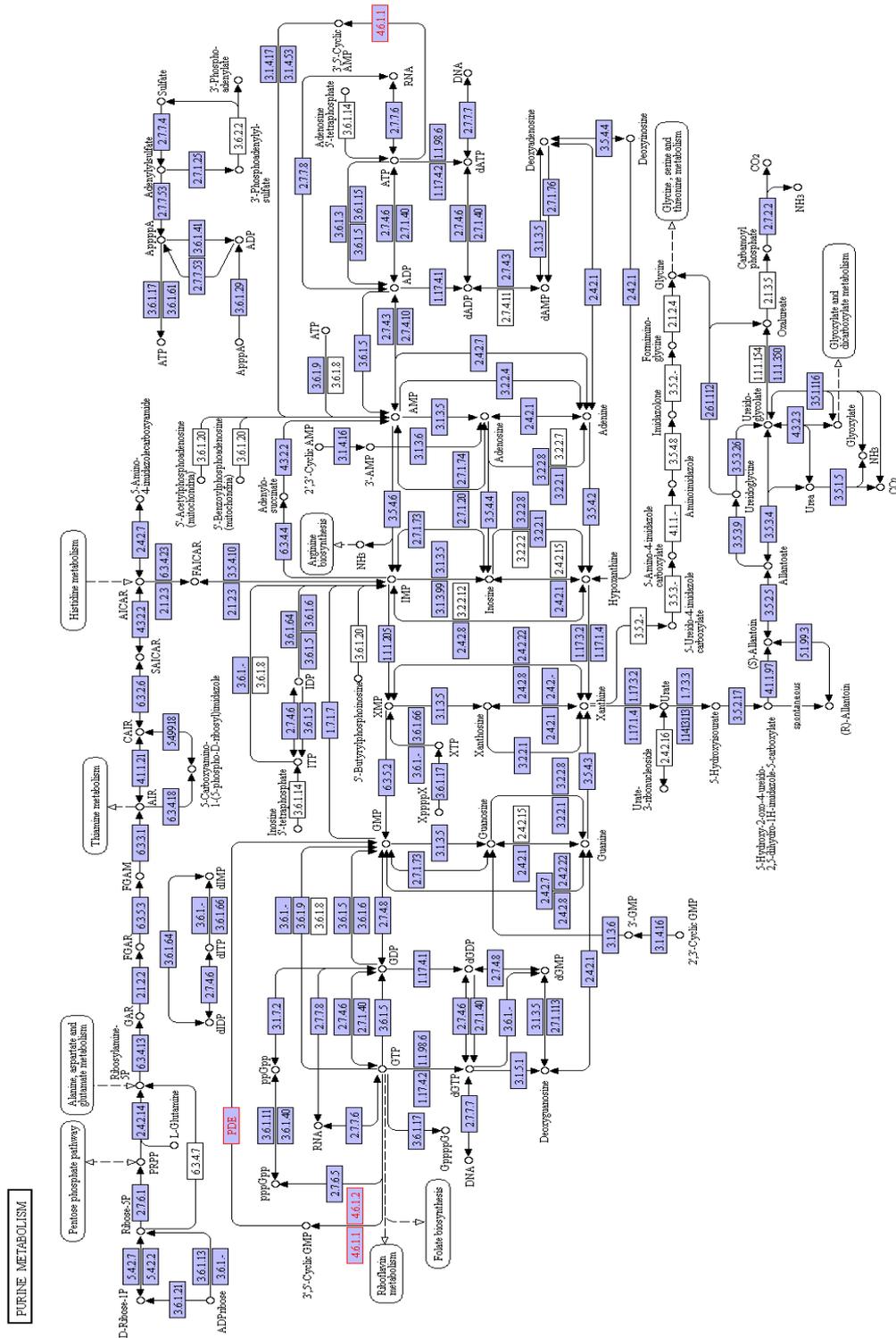
En el establecimiento de vesículas identificada con el término GO:0051650 (Tabla 16) se observa una participación adicional de las proteínas Amph, Arl6, Myo7a, Pclo y Syt2, con valores de  $\log_2FC$  de -1.69, -1.46, -5.11, -3.25 y -1.17 respectivamente (Tabla 17), en conjunto estos resultados sugieren una influencia directa del tratamiento de luz continua en la capacidad de comunicación sináptica en los peces expuestos a este fotoperiodo.

Otro de los procesos afectados estadísticamente es el del metabolismo de purinas, en la Figura 45 se observa la ruta metabólica con las proteínas Adcy8, Gucy2f, Pde5, Pde6a y Pde6b que presentan valores de  $\log_2FC$  de -2.58, -2.58, -2.04, -1.36 y -2.16 respectivamente (Tabla 17). Las enzimas adenilato y guanilato ciclasa (Adcy8, Gucy2f) son básicamente enzimas liasas que eliminan un grupo pirofosfato y crean enlaces fosfodiéster en los carbonos 3'-5' de la ribosa del ATP (Adenosin-trifosfato) y GTP (Guanosin-trifosfato). Esta reacción química convierte el ATP/GTP en AMPc (Adenosin-monofosfato cíclico) y GMPc (Guanosin monofosfato cíclico) respectivamente (Figura 44).

Estas moléculas son ampliamente conocidas como segundos mensajeros en diversas cascadas de transducción de señales al interior de la célula en respuesta a estímulos externos y hormonales (G protein coupled receptors, GPCRs), estos mecanismos son importantes ya que permiten a la célula adaptarse a su entorno inmediato. Las enzimas fosfodiesterasas Pde5, Pde6a y Pde6b, son enzimas que hidrolizan el GMPc convirtiéndolo en GMP, lo que inactiva la función de la molécula cíclica (Figura 44). Las enzimas fosfodiesterasas se encuentran con bajos niveles de expresión en las condiciones de luz continua.

Aunado a este análisis en la gráfica String (Figura 42) se observa la interacción de otras enzimas que también se encuentran involucradas en la cascada de señalización intracelular, Plch2 (Phospholipase C Eta 2) y Pip5k1a (Phosphatidylinositol-4-Phosphate 5-Kinase Type 1 Alpha) (Tabla 17); de hecho el análisis de enriquecimiento en términos de procesos biológicos GO:0009605 reporta 25 proteínas involucradas en respuesta a estímulos externos (Tabla 16) de las cuales 20 se encuentran con baja expresión en CL.

En conjunto los resultados del análisis de enriquecimiento de procesos biológicos de Kegg indican que las enzimas Adcy8 y Gucy2f, se encuentran con bajos niveles de expresión en las condiciones de luz continua lo que sugiere una baja producción de AMPc y GMPc (Figura 44), en consecuencia un bajo nivel de respuesta ante estímulos externos y hormonales.



**Figura 44.** Diagrama del metabolismo de purinas regulado negativamente en condiciones de luz continua para el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*. Los nombres en color rojo muestran las genes/proteínas afectadas; EC:4.6.1.1 (Adcy8, Adenilato ciclase 8), EC:4.6.1.2 (Gucy2f, Guanilato ciclase 2F); Pde (Pde5, cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase; Pde6a, Pde6b, rod cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase subunit alpha and beta); Purine metabolism ko 00230.



Además, la baja producción de fosfodiesterasas Pde5, Pde6a y Pde6b sugiere que existe una baja tasa de degradación de GMPc, esto probablemente es en respuesta a la baja producción de las moléculas cíclicas. Lo que probablemente permite a los organismos de luz continua prolongar la vida útil de la baja cantidad de GMPc producida.

Por último, se observa el proceso de fototransducción con las proteínas Cngb1, Guca1a, Gucy2f, Pde6a, Pde6b, Rgs9 y Slc24a1 (Figura 45), que presentan valores de log<sub>2</sub>FC de -1.74, -2.12, -2.58, -1.36, -2.16, -1.38 y -1.25 respectivamente (Tabla 17). En la Figura 45, se observa el proceso de fototransducción en la fase oscura y luminosa. Durante esta última fase la presencia de fotones activa la Rodopsina (Rh). Lo que permite la liberación de la transducina (Gt) que activa a la fosfodiesterasa (PDE) para hidrolizar al GMPc. Dicha hidrólisis resulta en el cierre de los canales catiónicos controlados por GMPc (CNG) y la consecuente hiperpolarización del fotorreceptor con la participación activa del NCKK, el cual disminuye los niveles de calcio intracelular. La hiperpolarización del potencial de membrana del fotorreceptor modula la liberación de los neurotransmisores hacia las neuronas adyacentes y la recuperación del fotorreceptor después del impulso lumínico implica la desactivación de los actores involucrados (Figura 45).

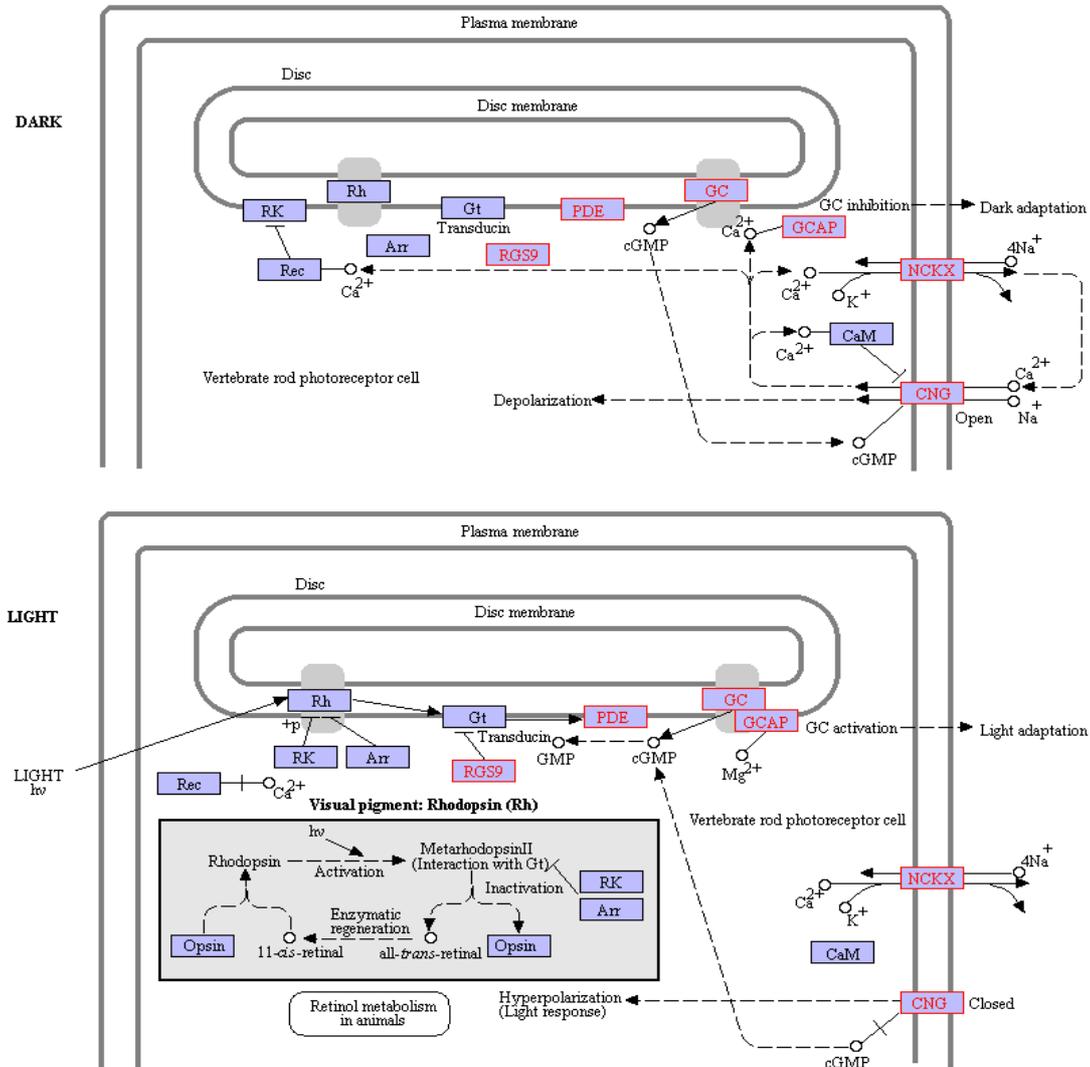
La Rodopsina fotolisada es fosforilada por la Rodopsina cinasa (RK) y subsecuentemente inmovilizada por la Arrestina (Arr), mientras que RGS9 desactiva la transducina (Gt). Por su parte el activador de guanilato ciclasa (GCAP) promueve la actividad de (GC) cuando existe una baja cantidad de Calcio y la inhibe cuando existe una cantidad elevada del catión, ambas proteínas son indispensables para la recuperación del fotorreceptor en la fase oscura (Figura 45).

Los organismos mantenidos en condiciones de luz continua presentan una baja expresión de los genes/proteínas Pde6a, Pde6b Cngb1 y Slc24a1, esto sugiere que en los fotorreceptores de estos organismos no se presenta una respuesta adecuada al estímulo lumínico, aunado a esto la baja producción de Guca1a, Gucy2f y Rgs9, sugiere que estos fotorreceptores no exhiben una recuperación adecuada, como ocurre normalmente en los organismos del fotoperiodo simulado control.

Según el análisis de enriquecimiento String, en el término de GO:007603 (Fototransducción de la luz visible) existen en total 12 genes/proteínas involucradas con baja expresión en el tratamiento de CL (Tabla 16), entre estos encontramos a Pde6c (Phosphodiesterase 6C, cGMP-specific, cone) y Opnsw1 (Opsin 1, cone pigments, short-wave-sensitive) con valores log<sub>2</sub>FC de -3.44 y -1.89 respectivamente (Tabla 17). Así como proteínas que están directamente relacionadas con el metabolismo de retinol que es indispensable para el buen funcionamiento de la Rodopsina, entre estas encontramos las proteínas Abca4 (ATP-binding cassette, sub-family A, member 4), ApoA4

(Apolipoprotein A-IV) y Stra6 (Stimulated by retinoic acid 6 homolog) con valores log2FC de -3.00 , -3.42 y -2.75 respectivamente (Tabla 17).

PHOTOTRANSDUCTION



**Figura 45.** Diagrama del proceso de fototransducción regulado negativamente en condiciones de luz continua para el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*. Los nombres en color rojo muestran las genes/proteínas afectados CNG (Cngb1, Cyclic nucleotide gated channel alpha 1); GC (GUCY2F, Guanilato cyclase 2F); GCAP (Guca1a, Guanylate cyclase activator 1), NCKK (Slc24a1, Solute carrier family 24a1 (sodium/potassium/calcium exchanger); PDE (Pde6A, Pde6B, rod cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase subunit alpha and beta); RGS9 (Regulator of G-protein signaling 9). Otros genes no afectados son RK (Rhodopsin kinase), Rh (Rhodopsin), Gt (Guanine nucleotide-binding protein G(t) subunit alpha 1/2), Arr (S-arrestin), Rec (Recoverin) y CaM (Calmodulin); Phototransduction ko 04744.

En la Figura 42 de String podemos observar las interacciones directas de Pde6c y Abca4 con el resto de las proteínas involucradas en la fototransducción. Por otro lado, las proteínas Stra6, Apoa4 y Opnsw1 no



presentan ninguna interacción, en conjunto una proteína que no se encuentra en el análisis string pero que es muy probable que este involucrada es la secuencia exclusiva de peces Sws2ab (Short-wavelength sensitive opsin 2AB) con un log<sub>2</sub>FC de -2.13, el cual es un pigmento visual sensible a la luz azul al igual que Opnsw1.

En conjunto estos resultados indican que existe una disminución sustantiva de la expresión de genes/proteínas involucradas en el proceso de fototransducción de los conos y bastones en los organismos de luz continua, esto sugiere que toda la maquinaria para percibir y transducir la información lumínica se encuentra suprimida, probablemente debido a la presencia de luz constante en el tratamiento de CL.

En el análisis de los procesos biológicos de Kegg se lograron identificar muchos otros procesos que son afectados por los genes/proteínas diferencialmente expresadas (Tabla 18 y Tabla 19). Uno de ellos es el proceso de regulación circadiana (Circadian entrainment, ko 04713) en el cual intervienen los genes/proteínas Adyc8 y Grin2a (Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2A) con valores de log<sub>2</sub>FC de -2.58 y -2.47 respectivamente (Tabla 17). El proceso de ritmos circadianos (Circadian rhythm, ko 04710) también es afectado con la disminución en la expresión de Rorb (RAR-related orphan receptor beta Nr1f2) con un valor de log<sub>2</sub>FC de -1.51 (Tabla 17).

Estos resultados indican que aunque no existe una diferencia estadística del análisis de enriquecimiento en estos procesos circadianos, si puede ocurrir una afectación cuando observamos los genes/proteínas de manera individual, lo que sugiere que en los organismos de luz continua estos procesos relacionados a los ritmos circadianos, se encuentran afectados a nivel de transcritos/proteínas individuales.

En las Tablas 18 y 19 existe una referencia más amplia de los procesos que se encuentran afectados por los genes/proteínas diferencialmente expresadas en el pez blanco según la base de datos de Kegg.

Es importante mencionar que la base de datos de Kegg aun es limitada por lo que al seguir los protocolos de anotación del programa solo se lograron identificar 39 genes/proteínas en los mapas de los procesos biológicos y rutas metabólicas. Esto solo representa el 33.91% de las 115 genes/proteínas anotadas, lo que muestra una carencia importante de información cuando se requiere conocer los procesos biológicos específicos en las cuales participan los genes/proteínas diferencialmente expresados.



**Tabla 18.** Procesos biológicos de genes/proteínas con alta expresión en el tratamiento de fotoperiodo simulado control (CS) en el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*.

Proceso	ID
ko04022 cGMP-PKG signaling pathway	ko:K04936 KCNMA1; potassium large conductance calcium-activated channel subfamily M alpha member 1 ko:K04952 CNGB1; cyclic nucleotide gated channel beta 1 ko:K08048 ADCY8; adenylate cyclase 8 [EC:4.6.1.1] ko:K13762 PDE5; cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase [EC:3.1.4.35] ko:K00227 SC5DL; Delta7-sterol 5-desaturase [EC:1.14.19.20]
ko01100 Metabolic pathways	ko:K00889 PIP5K; 1-phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase [EC:2.7.1.68] ko:K01242 CD38; ADP-ribosyl cyclase 1 [EC:3.2.2.6 2.4.99.20] ko:K19006 PLCH; phosphatidylinositol phospholipase C, eta [EC:3.1.4.11] ko:K01242 CD38; ADP-ribosyl cyclase 1 [EC:3.2.2.6 2.4.99.20]
ko04970 Salivary secretion	ko:K04936 KCNMA1; potassium large conductance calcium-activated channel subfamily M alpha member 1 ko:K08048 ADCY8; adenylate cyclase 8 [EC:4.6.1.1] ko:K13915 LYZ; lysozyme C [EC:3.2.1.17]
ko04144 Endocytosis	ko:K00889 PIP5K; 1-phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase [EC:2.7.1.68] ko:K12562 AMPH; amphiphysin
ko04972 Pancreatic secretion	ko:K01242 CD38; ADP-ribosyl cyclase 1 [EC:3.2.2.6 2.4.99.20] ko:K04936 KCNMA1; potassium large conductance calcium-activated channel subfamily M alpha member 1 ko:K08048 ADCY8; adenylate cyclase 8 [EC:4.6.1.1]
ko04666 Fc gamma R-mediated phagocytosis	ko:K00889 PIP5K; 1-phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase [EC:2.7.1.68] ko:K05753 WASF1; WAS protein family, member 1 ko:K12562 AMPH; amphiphysin
ko04024 cAMP signaling pathway	ko:K04952 CNGB1; cyclic nucleotide gated channel beta 1 ko:K05209 GRIN2A; glutamate receptor ionotropic, NMDA 2A ko:K08048 ADCY8; adenylate cyclase 8 [EC:4.6.1.1]
ko04911 Insulin secretion	ko:K04936 KCNMA1; potassium large conductance calcium-activated channel subfamily M alpha member 1 ko:K08048 ADCY8; adenylate cyclase 8 [EC:4.6.1.1] ko:K16882 PCLO; protein piccolo
ko04921 Oxytocin signaling pathway	ko:K01242 CD38; ADP-ribosyl cyclase 1 [EC:3.2.2.6 2.4.99.20] ko:K04858 CACNA2D1; voltage-dependent calcium channel alpha-2/delta-1 ko:K08048 ADCY8; adenylate cyclase 8 [EC:4.6.1.1]
ko04724 Glutamatergic synapse	ko:K05209 GRIN2A; glutamate receptor ionotropic, NMDA 2A ko:K08048 ADCY8; adenylate cyclase 8 [EC:4.6.1.1] ko:K12302 SLC17A6_7_8; MFS transporter, ACS family, solute carrier family 17 (sodium phosphate cotransporter) 6/7
ko04261 Adrenergic signaling in cardiomyocytes	ko:K04838 SCN5A; voltage-gated sodium channel type V alpha ko:K04858 CACNA2D1; voltage-dependent calcium channel alpha-2/delta-1 ko:K08048 ADCY8; adenylate cyclase 8 [EC:4.6.1.1]
ko04020 Calcium signaling pathway	ko:K01242 CD38; ADP-ribosyl cyclase 1 [EC:3.2.2.6 2.4.99.20] ko:K05209 GRIN2A; glutamate receptor ionotropic, NMDA 2A ko:K08048 ADCY8; adenylate cyclase 8 [EC:4.6.1.1]
ko04740 Olfactory transduction	ko:K04952 CNGB1; cyclic nucleotide gated channel beta 1 ko:K12321 GUCY2D_E_F; guanylate cyclase 2D/E/F [EC:4.6.1.2]
ko04723 Retrograde endocannabinoid signaling	ko:K08048 ADCY8; adenylate cyclase 8 [EC:4.6.1.1] ko:K12302 SLC17A6_7_8; MFS transporter, ACS family, solute carrier family 17 (sodium phosphate cotransporter) 6/7
ko05033 Nicotine addiction	ko:K05209 GRIN2A; glutamate receptor ionotropic, NMDA 2A ko:K12302 SLC17A6_7_8; MFS transporter, ACS family, solute carrier family 17 (sodium phosphate cotransporter) 6/7
ko05030 Cocaine addiction	ko:K05209 GRIN2A; glutamate receptor ionotropic, NMDA 2A ko:K13765 RGS9; regulator of G-protein signaling 9
ko05414 Dilated cardiomyopathy (DCM)	ko:K04858 CACNA2D1; voltage-dependent calcium channel alpha-2/delta-1 ko:K08048 ADCY8; adenylate cyclase 8 [EC:4.6.1.1]
ko04713 Circadian entrainment	ko:K05209 GRIN2A; glutamate receptor ionotropic, NMDA 2A ko:K08048 ADCY8; adenylate cyclase 8 [EC:4.6.1.1]
ko04810 Regulation of actin cytoskeleton	ko:K00889 PIP5K; 1-phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase [EC:2.7.1.68] ko:K05753 WASF1; WAS protein family, member 1
ko05231 Choline metabolism in cancer	ko:K00889 PIP5K; 1-phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase [EC:2.7.1.68] ko:K05753 WASF1; WAS protein family, member 1
ko04072 Phospholipase D signaling pathway	ko:K00889 PIP5K; 1-phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase [EC:2.7.1.68] ko:K08048 ADCY8; adenylate cyclase 8 [EC:4.6.1.1]
ko04015 Rap1 signaling pathway	ko:K05209 GRIN2A; glutamate receptor ionotropic, NMDA 2A ko:K08048 ADCY8; adenylate cyclase 8 [EC:4.6.1.1]
ko04270 Vascular smooth muscle contraction	ko:K04936 KCNMA1; potassium large conductance calcium-activated channel subfamily M alpha member 1 ko:K08048 ADCY8; adenylate cyclase 8 [EC:4.6.1.1]
ko00562 Inositol phosphate metabolism	ko:K00889 PIP5K; 1-phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase [EC:2.7.1.68] ko:K19006 PLCH; phosphatidylinositol phospholipase C, eta [EC:3.1.4.11]
ko04720 Long-term potentiation	ko:K05209 GRIN2A; glutamate receptor ionotropic, NMDA 2A ko:K08048 ADCY8; adenylate cyclase 8 [EC:4.6.1.1]



Procesos biológicos de genes/proteínas con alta expresión en el tratamiento de CS		
Proceso	ID	
ko04926 Relaxin signaling pathway	ko:K08048 ADCY8; adenylate cyclase 8 [EC:4.6.1.1]	
ko05166 HTLV-I infection		
ko04913 Ovarian steroidogenesis		
ko04925 Aldosterone synthesis and secretion		
ko04923 Regulation of lipolysis in adipocytes		
ko05032 Morphine addiction		
ko04371 Apelin signaling pathway		
ko04211 Longevity regulating pathway		
ko04971 Gastric acid secretion		
ko05200 Pathways in cancer		
ko04912 GnRH signaling pathway		
ko04114 Oocyte meiosis		
ko04750 Inflammatory mediator		
ko04916 Melanogenesis		
ko04611 Platelet activation		
ko04914 Progesterone-mediated		
ko04918 Thyroid hormone synthesis		
ko04727 GABAergic synapse		
ko04742 Taste transduction		
ko04540 Gap junction		
ko01522 Endocrine resistance		
ko04213 Longevity regulating pathway - multiple species		
ko04915 Estrogen signaling pathway		
ko04062 Chemokine signaling pathway		
ko04976 Bile secretion		
ko04725 Cholinergic synapse		
ko04080 Neuroactive ligand-receptor		ko:K05209 GRIN2A; glutamate receptor ionotropic, NMDA 2A
ko04728 Dopaminergic synapse		
ko04014 Ras signaling pathway		
ko05014 Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)		
ko05031 Amphetamine addiction		
ko05034, ko05010 Alcoholism, Alzheimer		ko:K04858 CACNA2D1; voltage-dependent calcium channel alpha-2/delta-1
ko05322 Systemic lupus erythematosus		
ko05410, ko04260 Hypertrophic cardiomyopathy, cardiac muscle contraction		
ko05412 Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy		
ko04010 MAPK signaling pathway		



Procesos biológicos de genes/proteínas con alta expresión en el tratamiento de CS	
Proceso	ID
ko04960 Aldosterone-regulated sodium	ko:K13302 SGK1; serum/glucocorticoid-regulated kinase 1 [EC:2.7.11.1]
ko04150, ko04068 mTOR, FoxO signaling pathway	
ko04151 PI3K-Akt signaling pathway	
ko05100 Bacterial invasion of epithelial cells	ko:K05753 WASF1; WAS protein family, member 1
ko04520 Adherens junction	
ko05131, ko05132 Shigellosis, Salmonella infection	
ko04139 Mitophagy - yeast	ko:K00889 PIP5K; 1-phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase [EC:2.7.1.68]
ko04070 Phosphatidylinositol signaling	
ko04011 MAPK signaling pathway -	ko:K01242 CD38; ADP-ribosyl cyclase 1 [EC:3.2.2.6 2.4.99.20]
ko00760 Nicotinate and nicotinamide metabolism	
ko04640 Hematopoietic cell lineage	
ko05169 Epstein-Barr virus infection	ko:K00227 SC5DL; Delta7-sterol 5-desaturase [EC:1.14.19.20]
ko00100 Steroid biosynthesis	
ko01130 Biosynthesis of antibiotics	
ko01110 Biosynthesis of secondary	ko:K10380 ANK; ankyrin
ko04624 Toll and lmd signaling	
ko05205 Proteoglycans in cancer	ko:K05644 ABCA4; ATP-binding cassette, subfamily A (ABC1), member 4
ko02010 ABC transporters	
ko04216 Ferroptosis	ko:K13162 PCBP2; poly(rC)-binding protein 2
ko04710 Circadian rhythm	ko:K08533 NR1F2; RAR-related orphan receptor beta
ko04924 Renin secretion	ko:K04936 KCNMA1; potassium large conductance calcium-activated channel subfamily M alpha member 1
ko04512 ECM-receptor interaction	ko:K06258 SV2; MFS transporter, VNT family, synaptic vesicle glycoprotein 2
ko05146 Amoebiasis	ko:K10955 MUC2; mucin-2
ko04745 Phototransduction - fly	ko:K08834 MYO3; myosin III [EC:2.7.11.1]
ko05202 Transcriptional misregulation in cancer	ko:K06532 PROM1; prominin 1
ko04130 SNARE interactions in vesicular transport	ko:K08486 STX1B_2_3; syntaxin 1B/2/3

ID (Genes/proteínas involucradas), información obtenida de la base de datos Kegg Orthology (KO).

Para el tratamiento de CL se observan principalmente procesos relacionados con el crecimiento, proliferación y supervivencia celular como la ruta PI3K-AKT, ko 04151; el proceso de adhesión focal ko 04510; el proceso de interacción de receptores de matriz extracelular ko 04512; el proceso de Hippo ko 04390; así como la mayoría de los procesos relacionados con Egrf (Epidermal growth factor receptor). Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente estos procesos no presentan una diferencia estadística significativa ( $FDR \geq 0.05$ ), por lo que solo existen diferencias a nivel de genes/proteínas individuales (Tabla 19).



**Tabla 19.** Procesos biológicos de genes/proteínas con alta expresión en el tratamiento de luz continua (CL) en el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*.

Procesos biológicos de genes/proteínas con alta expresión en el tratamiento de CL	
Proceso	ID
ko04151 PI3K-Akt signaling pathway	ko:K04361 EGFR; epidermal growth factor receptor [EC:2.7.10.1] ko:K06236 COL1A; collagen, type I, alpha ko:K06244 LAMB3; laminin, beta 3
ko04510 Focal adhesion	ko:K04361 EGFR; epidermal growth factor receptor [EC:2.7.10.1] ko:K06236 COL1A; collagen, type I, alpha ko:K06244 LAMB3; laminin, beta 3
ko05165 Human papillomavirus infection	ko:K04361 EGFR; epidermal growth factor receptor [EC:2.7.10.1] ko:K06236 COL1A; collagen, type I, alpha ko:K06244 LAMB3; laminin, beta 3
ko04933 AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	ko:K06236 COL1A; collagen, type I, alpha ko:K09203 EGR1; early growth response protein 1
ko04926 Relaxin signaling pathway	ko:K04361 EGFR; epidermal growth factor receptor [EC:2.7.10.1] ko:K06236 COL1A; collagen, type I, alpha
ko04371 Apelin signaling pathway	ko:K06827 CTGF; connective tissue growth factor ko:K09203 EGR1; early growth response protein 1
ko05146 Amoebiasis	ko:K06236 COL1A; collagen, type I, alpha ko:K06244 LAMB3; laminin, beta 3
ko05200 Pathways in cancer	ko:K04361 EGFR; epidermal growth factor receptor [EC:2.7.10.1] ko:K06244 LAMB3; laminin, beta 3
ko04512 ECM-receptor interaction	ko:K06236 COL1A; collagen, type I, alpha ko:K06244 LAMB3; laminin, beta 3
ko05145 Toxoplasmosis	ko:K06244 LAMB3; laminin, beta 3
ko04962 Vasopressin-regulated water reabsorption	ko:K09876 AQP3; aquaporin-3
ko04390 Hippo signaling pathway	ko:K06827 CTGF; connective tissue growth factor
ko04974 Protein digestion and absorption	ko:K06236 COL1A; collagen, type I, alpha
ko04611 Platelet activation	ko:K06236 COL1A; collagen, type I, alpha
ko05222 Small cell lung cancer	ko:K06244 LAMB3; laminin, beta 3
ko04810 Regulation of actin cytoskeleton	
ko05231, ko05230 Choline, central carbon metabolism in cancer	
ko04912 GnRH signaling pathway	
ko05020 Prion diseases	
ko05218 ko05214 Melanoma , Glioma	
ko04214 Apoptosis - fly	
ko05206, ko05205 MicroRNAs and proteoglycans in cancer	
ko05213, ko05219 Endometrial, Bladder cancer	
ko05120 Epithelial cell signaling in H. pylori infection	
ko05166 HTLV-I infection	
ko04144 Endocytosis	
ko04020 Calcium signaling pathway	
ko04072 Phospholipase D signaling pathway	ko:K04361 EGFR; epidermal growth factor receptor [EC:2.7.10.1]
ko05160 Hepatitis C	
ko04068, ko04066 FoxO, HIF-1 signaling pathway	
ko01522 Endocrine resistance	
ko05223 Non-small cell lung cancer	
ko04915 Estrogen signaling pathway	
ko04010 MAPK signaling pathway	
ko04060 Cytokine-cytokine receptor interaction	
ko04540, ko04520 Gap, Adherens junction	
ko04014, ko04015 Ras, Rap1 signaling pathway	
ko04320 Dorso-ventral axis formation	
ko04921 Oxytocin signaling pathway	
ko04012 ErbB signaling pathway	
ko01521 EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	
ko05215, ko05212, ko05224 Prostate, Pancreatic, Breast cancer	

ID (Genes/proteínas involucradas), información obtenida de la base de datos Kegg Orthology (KO).



### 3.4. DISCUSIONES Y CONCLUSIONES

#### 3.4.1. Crecimiento, consumo de alimento y supervivencia en condiciones de luz continua

Como se ha mencionado en capítulos anteriores, el fotoperiodo modula las actividades alimentación, crecimiento y reproducción en los peces (Volkoff *et al.*, 2010; Pittman *et al.*, 2013; Takahashi *et al.*, 2016; Chi *et al.*, 2017; Espigares *et al.*, 2017). Aunque los mecanismos moleculares detrás de dichos efectos no han sido elucidados. En este capítulo presentamos por primera vez, el transcriptoma comparativo de un teleosteo en crecimiento diferencial debido a un tratamiento de luz continua.

En juveniles del pez blanco de Pátzcuaro (*C. estor*), un tratamiento de 90 días con fotoperiodo de luz continua (CL) incrementa de manera significativa ( $p \leq 0.05$ ) la masa corporal (66.14 %), la longitud estándar (17.95 %) y la tasa de crecimiento específico (10.34 %) de los organismos comparado con el fotoperiodo simulado control (Tabla 4 y 5). Este efecto ya se había reportado en experimentos previos con un incremento significativo de la masa (43.26 %) y la longitud (12.84 %) en organismos mantenidos en condiciones de luz continua durante 90 días (Martínez-Chávez *et al.*, 2014). Las diferencias entre estos experimentos similares con *C. estor*, probablemente se deben a la temporalidad del inicio del tratamiento de luz continua. Mientras que en el presente experimento se aplicó el tratamiento de luz continua a partir de la fertilización, Martínez-Chávez y colaboradores, lo aplicaron a partir de la eclosión. Esto sugiere que si el tratamiento se aplica desde la fase embrionaria, puede incrementarse de manera importante el crecimiento.

Efectos similares se reportan en larvas de corvallo (*Umbrina cirrosa*), con un incremento significativo en masa (56.84 %) y longitud (17.98 %) bajo un tratamiento de 111 días con CL (Ayala *et al.*, 2013). Además, en larvas de pirulina *Pyrrhulina brevis*, en un experimento de 15 días bajo CL, se encontró un incremento significativo de la longitud (21.03 %) y la masa (74.03 %) (Veras *et al.*, 2016). En experimentos de mayor duración (6 meses) en el bacalao del atlántico (*Gadus morhua*) se reporta un incremento significativo del 10.5% en condiciones de luz continua (Nagasawa *et al.*, 2012) y para el salmón del atlántico (*Salmo salar*), un experimento de 24 meses, reporta un incremento diferencial en masa del 87.6% en los organismos de CL (Handeland *et al.*, 2013). No obstante en larvas de lubina (*Dicentrarchus labrax*) no se reportan cambios significativos en la masa adquirida, pero si en la longitud (8.57 %) bajo 40 días de tratamiento (Villamizar *et al.*, 2009).

Caso contrario se reporta en juveniles de lenok (*Brachymystax lenok*) donde no existen diferencias significativas del crecimiento (masa) entre ambos fotoperiodos, pero si se presenta un mejor crecimiento en condiciones de oscuridad constante (Liu *et al.*, 2015). En larvas del pez cebrá (*Danio rerio*) un tratamiento de 30 días bajo luz continua inhibió significativamente la ganancia



de peso (71.09 %), con respecto a los organismos mantenidos en el fotoperiodo simulado control (Villamizar *et al.*, 2014). En otras especies como el tambaqui (*Colosoma macropomum*) también se observa una disminución significativa del crecimiento (14%) bajo el efecto de la luz continua en juveniles (Aride *et al.*, 2006) así como en el turbot (*Scophthalmus maximus*) donde la luz continua disminuye el crecimiento en 11% con respecto a los controles (Imsland *et al.*, 2013).

Estos resultados indican que en general los tratamientos de luz continua incrementan significativamente el crecimiento y la tasa de crecimiento específico en los peces. Sin embargo, existen respuestas especie-específicas y de temporalidad, donde se observa un efecto nulo o inhibitorio del crecimiento, debido probablemente a las características ecológicas (nicho, hábitos diurnos vs nocturnos) y fisiológicas de dichas especies así como a las aproximaciones experimentales para cada caso específico.

Por otro lado en *C. estor*, la relación masa-longitud indica que los organismos exhiben un crecimiento alométrico positivo, sin diferencias significativas entre los tratamientos ( $p \geq 0.05$ ). Es decir, que para ambas condiciones existe una mayor ganancia proporcional de la masa con respecto a la longitud (Figura 23). En el factor de condición (K) tampoco se encontraron diferencias significativas ( $p \geq 0.05$ ) entre los tratamientos, con valores de  $0.877 \pm 0.053$  para CL y de  $0.861 \pm 0.065$  para CS, a las 12 SPE (Tabla 5). Esto mismo fue observado en experimentos previos con *C. estor*, donde se reportan factores de condición de 0.540 y 0.5421 para CL y CS respectivamente (Martínez-Chávez *et al.*, 2014), por lo que tampoco existen diferencias significativas en esta variable para diferentes experimentos.

Los valores observados sugieren condiciones de bienestar general en los organismos mantenidos en ambos tratamientos y que la luz continua no afecta el factor de condición en la especie. En otros peces tampoco se ha reportado un cambio significativo del factor de condición por el uso del fotoperiodo como en el pejerrey (*Odonthesthes argentinensis*) (Freitas *et al.*, 2009), en el bacalao (*G. morhua*) (Karlsen *et al.*, 2006), en el pez beta (*Betta splendens*) (Giannecchini *et al.*, 2012), el pez gato africano (*Clarias gariepinus*) (Solomon y Okomoda, 2012) y la mojarra verde (*Cichlassoma beanii*) (Aragón-Flores *et al.*, 2017).

Estos resultados indican que el fotoperiodo de luz continua incrementa el crecimiento sin afectar el factor de condición y la relación masa-longitud con respecto a los organismos que se encuentran en el fotoperiodo simulado control. Debido a estas observaciones se sugiere que la aplicación de un fotoperiodo de luz continua en *C. estor*, es una herramienta útil que permite disminuir los tiempos de crecimiento y aumentar la ganancia de peso sin afectar el bienestar general de los organismos de esta especie.



Con respecto al consumo de alimento y al factor de conversión alimenticia (FCA) en *C. estor* se presentan diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los tratamientos de CL y CS (Tabla 5). Observaciones similares se reportan para el salmón (*S. salar*) donde los organismos bajo condiciones de luz continua consumen una mayor cantidad de alimento pero presentan una mejor FCA con respecto a los controles (Nordgarden *et al.*, 2003). Esto sugiere que los organismos de luz continua consumen una mayor cantidad de alimento, pero son más eficientes en la utilización del mismo.

En contraste, reportes en el lenok (*B. lenok*) indican un incremento significativo en el consumo de alimento y el FCA bajo la luz continua, así como una mayor eficiencia bajo un tratamiento de 24 horas de obscuridad (Liu *et al.*, 2015). Incluso en la carpa (*Cyprinus carpio*) se reporta un incremento significativo del FCA en el tratamiento de luz continua (Ghomi *et al.*, 2011), por lo que en estos organismos no existe una mejor eficiencia en la conversión alimenticia bajo la luz continua. Además, en la tilapia (*Oreochromis niloticus*) y el esturión pérsico (*Acipenser persicus*) no se observaron cambios significativos en el consumo de alimento, el FCA y el crecimiento entre los tratamientos fotoperiodicos (Falihatkar *et al.*, 2012; Veras *et al.*, 2013), así como en el bacalao de agua dulce (*Lota lota*) donde fotoperiodos extremos (24 horas luz vs 24 horas obscuridad) no tienen ninguna influencia en el FCA (Trejchel *et al.*, 2014).

Los diferentes reportes sugieren nuevamente que cada especie presenta respuestas particulares a los cambios ambientales, lo que imposibilita realizar una generalización en peces teleósteos. Por lo que cada caso debe de abordarse en forma individual y analizar diferentes aspectos para realizar conclusiones aplicables a cada especie. En el caso de *C. estor*, se observa un mayor consumo de alimento en luz continua pero una mejor conversión alimenticia. Por lo tanto el uso de este fotoperiodo en conjunto con una alimentación constante puede ser aplicado a la especie ya que los organismos son más eficientes en términos de FCA con respecto a los organismos del fotoperiodo simulado control.

El análisis de supervivencia en *C. estor* (Figura 24) indica que no existen diferencias significativas entre los tratamientos ( $p \geq 0.05$ ). De manera similar en la carpa (*C. carpio*) (Ghomi *et al.*, 2011), en el esturión pérsico (*A. persicus*) (Falihatkar *et al.*, 2012), en pirulina (*P. brevis*) (Veras *et al.*, 2013) y la tilapia (*O. niloticus*) (Veras *et al.*, 2016) no se reportan cambios significativos en la supervivencia. En discrepancia en el corvallo (*U. cirrosa*) se presenta una supervivencia de 1.37% en el tratamiento de luz continua vs 3.37% en el tratamiento control (Ayala *et al.*, 2013); en el lenok (*B. lenok*) existe un 79.67% de supervivencia en luz continua y 88.67% en el control (Liu *et al.*, 2015).

Por otro lado en el presente trabajo, en *C. estor* se observó que los organismos sometidos a luz continua (Figura 25), presentan deformidades en la mandíbula, opérculo y columna vertebral (10.3 % en CL vs 1.13 % en CS;  $p \leq 0.05$ ). En el pez cebrá (*D. rerio*) se reportan valores similares con un 8.6% en luz continua y



un 1.3% en el control (Villamizar *et al.*, 2014), así como en el salmón (*S. salar*) con 3.3% en condiciones naturales y 10% en iluminación continua (Wargelius *et al.*, 2009). En otros trabajos también se reportan deformaciones en la mandíbula cuando se exponen las larvas a un fotoperiodo de luz continua, tal es el caso de la lubina (*D. labrax*) y el pez plano (*Solea senegalensis*), donde el 40- 60% de organismos presentan deformidades que incrementan el porcentaje de mortalidad bajo este tratamiento fotoperiodico (Villamizar *et al.*, 2009; Blanco-Vives *et al.*, 2010). Este no fue el caso del pez blanco (*C. estor*), ya que a pesar de que existen deformaciones en el 10.3% de los individuos de luz continua, no se presentan diferencias significativas en la supervivencia entre los tratamientos, esto sugiere que las deformidades presentadas no son mortales para los organismos mantenidos en el fotoperiodo de luz continua. Por lo tanto en futuros trabajos es necesario abordar y resolver esta problemática, para evitar las afectaciones en el desempeño y la funcionalidad de los organismos en cultivo.

De manera general se concluye que un fotoperiodo de luz continua puede ser aplicado para mejorar el crecimiento y la conversión de alimento, sin tener afectaciones en la supervivencia de embriones y larvas del pez blanco de Pátzcuaro (*C. estor*). Sin embargo, se requiere de estudios posteriores para disminuir la presencia de deformidades músculo-esqueléticas en estos organismos, que permitan aplicar este tipo de fotoperiodo en la producción comercial de la especie.

### **3.4.2. Niveles de las hormonas circadianas: melatonina y cortisol en condiciones de luz continua**

La melatonina es una molécula que es regulada por el fotoperiodo y que participa directamente en procesos de alimentación, crecimiento, reproducción y locomoción, además, está altamente conservada en vertebrados (Lima-Cabello *et al.*, 2014; Cowan *et al.*, 2017). En el pez espinoso (*Gasterosteus aculeatus*) con el método de HPLC (Cromatografía de líquidos de alta eficiencia) se reporta un incremento significativo en la concentración de melatonina durante la fase nocturna en el ojo, el cerebro, la piel y el riñón, (Kulczykowska *et al.*, 2017); así como en plasma y tracto gastrointestinal de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Muñoz-Perez *et al.*, 2016) y en el plasma de la carpa tropical (*Catla catla*) (Rajiv *et al.*, 2017).

Con otras metodologías de radioinmuniensayo (RIA) también se reportan incrementos significativos en la concentración de melatonina durante la fase oscura, en especies como la dorada (*Sparus auratus*) (Kalamariz *et al.*, 2009) y el salmón (*S. salar*) (Huang *et al.*, 2010). Además, en este último no se reportan cambios significativos en las concentraciones de los organismos mantenidos en luz continua. De la misma manera en el pez sapo (*Porichthys notatus*) (Feng y Bass, 2016), en la lubina (*D. labrax*) (Bayarri *et al.*, 2010), en la tilapia (*O. niloticus*) y en el pez gato africano (*Clarias gariepinus*) (Martínez-



Chávez *et al.*, 2008), no se reportan cambios significativos en la concentración de melatonina en organismos bajo condiciones de iluminación continua.

En el presente trabajo con pez blanco (*C. estor*) se realizaron pruebas exhaustivas con el método de ELISA para determinar la influencia de los fotoperiodos de CL y CS en la concentración de melatonina. Los resultados obtenidos en el tratamiento de luz continua (CL) indican que no existe variación significativa entre las fases lumínicas ( $p \geq 0.05$ ). Esto concuerda con los estudios realizados en otras especies de peces, donde la luz continua suprime la producción de melatonina en los organismos. Además, se esperaba obtener diferencias significativas entre las fases del fotoperiodo simulado control (CS), con un incremento de la concentración de melatonina durante la fase oscura. Sin embargo, tampoco se encontraron diferencias significativas ( $p \geq 0.05$ ) en este tratamiento (Tabla 6). Este último resultado en CS puede deberse a fallas en la sensibilidad de los kits de ELISA utilizados, ya que en las pruebas realizadas con los diferentes lotes de kits se encontraron inconsistencias en los resultados, probablemente debido a que los kits comerciales están estandarizados para plasma humano y no para extractos crudos de cuerpo de peces. Por lo tanto, los datos obtenidos en *C. estor* deben tratarse con precaución y se recomienda para estudios futuros el uso de otras metodologías más robustas como la de HPLC, con la cual se puedan verificar los resultados del presente trabajo.

Otra molécula importante en el control de los ritmos circadianos es el cortisol ya que en peces se ha observado que inhibe directamente la producción de melatonina en la glándula pineal (Nikaido *et al.*, 2010; Lopez-Patiño *et al.*, 2014). En *C. estor* se observa un ritmo circadiano típico de organismos diurnos en el tratamiento de fotoperiodo simulado control. Sin embargo, para los organismos mantenidos en luz continua existen ritmos ultradianos (menores a 24 horas) con la presencia de tres puntos de acrofase y tres de batifase, con diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre tratamientos (Figura 26). En el salmón (*S. salar*) los organismos mantenidos en luz continua tampoco presentan un ciclo circadiano típico, ya que se observa de manera constante mayores niveles de cortisol en plasma vs el fotoperiodo simulado control, lo que sugiere condiciones de estrés en los organismos de luz continua (Huang *et al.*, 2010).

En el trabajo desarrollado con *C. estor* se observa que los niveles de cortisol en cuerpo completo del pez se encuentran por debajo de las concentraciones basales para el fotoperiodo simulado control (Figura 26). Por lo que en *C. estor* la luz continua parece no representar un efecto de estrés al menos a nivel de la producción de cortisol en estos organismos. Hallazgos similares se observaron en la perca (*Perca fluviatilis*), donde no se observan diferencias significativas de las concentraciones de cortisol en el agua. En los diferentes tratamientos de fotoperiodo utilizados y sugiere que tanto la luz continua como los cambios en intensidad no incrementan los niveles de estrés (Brüning *et al.*, 2015). En la brema de roca (*Oplegnathus fasciatus*) tampoco existen diferencias



significativas en el cortisol plasmático cuando los organismos son expuestos a diferentes intensidades de iluminación (Biswas y Takii, 2016). Así como en el esturión persa (*A. persicus*) donde no se observan diferencias en los niveles de cortisol en plasma entre los fotoperiodos de luz continua y el control (Falahatkar *et al.*, 2012).

Debido a todas las características observadas de los perfiles de cortisol en *C. estor*. Se concluye que en esta especie el fotoperiodo de luz continua aplicado desde la fertilización produce una disrupción circadiana en la producción del corticoesteroide, lo que genera ritmos ultradianos y una disminución los niveles de concentración con respecto al fotoperiodo simulado control. Estos resultados son coincidentes con los mayores niveles de crecimiento y alimentación observados en los peces de CL, ya que por regla general si un pez se encuentra estresado, cesa su alimentación y desarrollo, fenómeno que no se observa en estos organismos expuestos a condiciones de luz continua.

Recientemente un estudio en *S. salar* indica que un tratamiento físico estresante en las primeras fases de desarrollo (embrión/larva) están relacionados con una mejora en el crecimiento de los organismos, debido a una probable respuesta hormética (Moghadam *et al.*, 2017). Posiblemente la exposición desde la fertilización a condiciones de luz continua puede influenciar el crecimiento y la respuesta a estrés desde fases muy tempranas en *C. estor*. Sin embargo, se requiere de estudios específicos en las etapas embrionarias y larvales para describir las respuestas iniciales a la exposición de un ambiente de iluminación continua.

Los ritmos ultradianos indicados en el tratamiento de CL, probablemente se deben a los ritmos de alimentación que presentan los organismos bajo estas condiciones lumínicas, ya que como se ha descrito en diversos trabajos, la alimentación eleva los niveles de cortisol en los peces, lo que ocasiona a su vez un efecto anorexigénico (Volkoff, 2016; Rønnestad *et al.*, 2017). Sin embargo, se requiere de estudios futuros con mayor detalle para clarificar esta hipótesis de los ritmos ultradianos observados en *C. estor*. En conclusión la aplicación del fotoperiodo de luz continua en el cultivo del pez blanco de Pátzcuaro (*C. estor*) parece no representar un factor de estrés, por lo tanto sugiere una alta plasticidad de los organismos para adaptarse, sobrevivir y crecer bajo estas condiciones lumínicas, lo que permite utilizar este tipo de técnicas de iluminación para disminuir los tiempos de cultivo durante las fases tempranas de desarrollo en esta importante especie.

### **3.4.3. Análisis de expresión de genes por secuenciación masiva RNA-seq**

#### **3.4.3.1. Ensamble y anotación funcional del transcriptoma *De Novo***

El transcriptoma *De Novo* realizado en la cabeza de juveniles del pez blanco de Pátzcuaro (*C. estor*) es la primer aproximación de un estudio de este tipo para todo un género de peces (*Chirostoma*). Por lo tanto el presente trabajo



representa un avance importante para conocer la información transcriptómica de los genes expresados en estas especies que presentan un alto valor social, económico y/o ambiental.

Cabe mencionar que actualmente existe un consorcio internacional que se encuentra enfocado en realizar 1000 transcriptomas de peces y de los cuales se han realizado 158 transcriptomas (<http://www.fisht1k.org>; Sun *et al.*, 2016<sup>b</sup>). Por lo que este trabajo en *C. estor* también colabora con el esfuerzo internacional del consorcio fish1K, para generar información transcriptómica en las especies de interés comercial y científico. Los diferentes transcriptomas de peces presentan una amplia diversidad de valores obtenidos de los ensamblajes *De Novo*. En la Tabla 20 se realiza una comparación de las principales características del ensamblaje *De Novo* de *C. estor* con algunos de los ensamblajes de peces reportados en la literatura reciente, ordenados de acuerdo al porcentaje de contigs anotados (%TCA).

**Tabla 20.** Comparación de valores obtenidos en transcriptomas *De Novo* de peces vs transcriptoma *De Novo* en *C. estor*.

Comparación de valores obtenidos en transcriptomas <i>De Novo</i> de peces vs transcriptoma <i>De Novo</i> en <i>C. estor</i>												
No	Especie	Contigs	LPC (pb)	N50 (pb)	TCA	% TCA	GOBP	GOMF	GOCC	KEGG	Tejidos	Referencia
1	<i>Sarcocheilichthys sinensis</i>	194,930	1,151	1,924	141,669	72.68%	92,321	36,665	68,770	14,943	Cerebro, hígado, piel, músculo, ojo, hipotálamo, hipófisis, corazón, vaso, riñón, intestino, branquias y testículo	Zhu <i>et al.</i> , 2017
2	<i>Larimichthys polyactis</i>	134,439	688	1,032	93,990	69.91%	23,362	25,482	15,052	NR	Cerebro, hígado, corazón, gónada, branquias, intestino y músculo	Liu <i>et al.</i> , 2017
3	<i>Acipenser sinensis</i>	86,027	950	1,221	58,549	68.06%	170,512	46,967	130,517	12,557	Gónada	Yue <i>et al.</i> , 2015
4	<i>Clarias macrocephalus</i>	53,149	765	1,283	33,428	62.89%		18,603		20,673	Hígado	Chatchaiphan <i>et al.</i> , 2017
5	<b><i>Chirostoma estor</i></b>	<b>68,960</b>	<b>787</b>	<b>1,324</b>	<b>43,314</b>	<b>62.81%</b>	<b>126,929</b>	<b>36,670</b>	<b>98,712</b>	<b>14,711</b>	<b>Cabeza completa</b>	<b>Presente trabajo</b>
6	<i>Synechogobius hasta</i>	60,217	815	1,298	37,764	62.71%		21,721		25,808	Hígado	Chen <i>et al.</i> , 2016
7	<i>Megalobrama amblycephala</i>	46,615	939	1,593	25,180	54.02%		17,773		18,780	Branquias	Sun <i>et al.</i> , 2016a
8	<i>Coryphaena hippurus</i>	60,842	711	1,093	30,518	50.16%		40,408		NR	Larva completa	Xu <i>et al.</i> , 2017
9	<i>Salmo trutta</i>	75,970	668	NR	36,902	48.57%	89,576	34,043	40,896	10,182	Piel	Malachowicz <i>et al.</i> , 2017
10	<i>Trachinotus ovatus</i>	156,094	1,179	2,404	75,586	48.42%	18,823	18,064	17,838	38,172	Cerebro, hígado, hipófisis, corazón, vaso, riñón, branquias y gónadas	Zhenzhen <i>et al.</i> , 2014
11	<i>Genypterus chilensis</i>	48,480	1,153	846	21,272	43.88%	16,255	16,706	15,809	NR	Hígado y músculo	Aedo <i>et al.</i> , 2014
12	<i>Morone chrysops</i>	185,531	1,371	3,132	76,884	41.44%		157,966		NR	Cerebro, hígado, vaso, riñón, gónada, branquias, intestino y tronco	Li <i>et al.</i> , 2014
13	<i>Acipenser naccarii</i>	44,232	512	489	17,734	40.09%	3,811	1,775	758	3,634	Cerebro y Gónada	Vidotto <i>et al.</i> , 2013
14	<i>Morone saxatilis</i>	203,587	1,263	2,915	79,062	38.83%		154,390		NR	Cerebro, hígado, vaso, riñón, gónada, branquias, intestino y tronco	Li <i>et al.</i> , 2014
15	<i>Lateolabrax japonicus</i>	99,392	972	2,298	37,086	37.31%		19,821		9,837	Hígado, intestino, riñón, vertebra, escama, branquia e hipófisis	Lu <i>et al.</i> , 2017
16	<i>Tor putitora</i>	61,042	463	584	22,194	36.36%	60,846	21,603	49,377	8,504	Hígado	Kumar <i>et al.</i> , 2017
17	<i>Coilia nasus</i>	148,845	580	NR	53,617	36.02%		25,850		13,091	Cerebro	Fang <i>et al.</i> , 2015
18	<i>Melanotaenia fluviatilis</i>	148,394	1,539	3,367	43,841	29.54%	7,445	32,984	24,457	785	Hígado, cerebro y gónada	Bain <i>et al.</i> , 2015
19	<i>Larimichthys crocea</i>	213,058	653	1,141	40,123	18.83%	26,247	27,184	28,057	13,995	Riñón, vaso, hígado, branquia y músculo	Sun <i>et al.</i> , 2017
20	<i>Perca flavescens</i>	212,180	695	1,066	36,117	17.02%		72,801		9,811	Músculo y gónada	Li <i>et al.</i> , 2017

Contigs (Número de contigs totales obtenidos); LPC (Longitud promedio en pares de bases de los contigs); N50 (Longitud en pares de bases de al menos el 50% de los contigs); TCA (Total



de contigs con anotación); %TCA (Porcentaje del total de contigs anotados con respecto al número de contigs totales obtenidos); GOBP (Anotación de procesos biológicos en términos de GO); GOMF (Anotación de funciones moleculares en términos de GO); GOCC (Anotación de componentes celulares en términos de GO); KEGG (Anotación de genes ortólogos de Kegg); NR (No reportado).

Como puede observarse en la Tabla 20, el transcriptoma de *C. estor*, se encuentra en la quinta posición de acuerdo al porcentaje de contigs anotados con un 62.81%. La mayor cantidad de contigs anotados se presenta en *S. sinensis* con un 72.68% y el menor porcentaje se presenta en *P. flavescens* con un 17.02%. Estas variaciones en el porcentaje de contigs anotados se deriva principalmente de las diferentes estrategias utilizadas para realizar el ensamblado y la anotación funcional de los transcriptomas *De Novo*, así como las características inherentes de los diferentes tejidos procesados y las aproximaciones experimentales particulares de cada estudio desarrollado.

Adicionalmente en los genomas de los teleósteos han ocurrido múltiples duplicaciones; primero ocurrieron dos duplicaciones genómicas en vertebrados hace aproximadamente 500 y 450 millones años (Dehal y Boore, 2005; Cañestro, 2012; Singh *et al.*, 2015) y una tercera ronda de duplicación específica de los teleósteos hace aproximadamente 300 millones de años (Braasch y Postlethwait, 2012; Glasauer y Neuhauss, 2014; Inoue *et al.*, 2015).

Esto significa que la cantidad de genes encontrados en los teleósteos, supera al número de genes encontrados en otros vertebrados. Además, de que es el grupo más diverso de organismos con alrededor de 33,400 especies (Fishbase, 2016). Esto supone que existe una alta posibilidad de descubrir genes nuevos, por lo que no es improbable que exista una carencia de genes anotados en los transcriptomas y genomas de peces cuando se compara con las bases de datos internacionales.

Para el transcriptoma de *C. estor* se considera que el porcentaje de anotación obtenido fue alto y se encuentra dentro de los parámetros indicados para otros transcriptomas *De Novo* en peces. En conjunto estas características observadas apuntan claramente a que existe una carencia de información importante para la anotación de los transcriptomas de peces, por lo que se requiere del desarrollo de intensas estrategias de investigación que permitan acortar la brecha de información existente en las diferentes especies.

En la Tabla 20 también se advierte, una gran variabilidad en la cantidad de contigs obtenidos en los diferentes transcriptomas, con un intervalo de 44,232 en *A. naccarii* hasta 213,058 en *L. crocea*. En *C. estor* se obtuvieron 68,960 contigs, con un LPC de 787 pb y un N50 de 1,324 pb. En contraste, *T. putitora* presenta el menor valor de LPC con 463 pb y *M. fluviatilis* presenta el mayor valor con 1,539 pb. Para los valores de N50, *A. naccarii* presenta el menor valor con 489 pb y *M. fluviatilis* exhibe el mayor valor con 3,367 pb. Estos resultados indican que el ensamble transcriptómico de *C. estor* presenta



valores de número de contigs, LPC y N50 dentro de los intervalos reportados para otros transcriptomas de peces.

Un trabajo reciente con pejerreyes (*Odonthestes bonariensis* y *O. argentiniensis*) indica la obtención de 168,570 transcriptos, con 40,384 transcriptos que presentaron marcos abiertos de lectura y un N50 de 838. Sin embargo, este reporte no indica la cantidad de transcriptos efectivamente anotados ni los términos biológicos de GO y procesos biológicos de Kegg, por lo cual no fue incluido en la Tabla 20. Esto probablemente a que no se reporta como un ensamble *De Novo*, ya que realizan un mapeo de los transcriptos contra un genoma ensamblado de *O. bonariensis* (Hughes *et al.*, 2017).

El transcriptoma de *C. estor* se encuentra dentro de los mayores valores de anotación frente a las bases de datos de GO (Gene ontology) y Kegg; con 126,929 términos para procesos biológicos, 36,670 para funciones moleculares, 98,712 para componentes celulares y 14,711 términos de KO (Kegg orthology) cuando se compara con otros transcriptomas *De Novo* (Tabla 20). En conjunto el ensamble transcriptómico *De Novo* en *C. estor* presenta valores aceptables dentro de los intervalos para otros transcriptomas reportados, por lo que se considera la validación de los resultados obtenidos en el presente trabajo.

En conclusión, esta caracterización transcriptómica provee una cantidad abundante de información genómica y herramientas moleculares básicas de alta calidad en el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*. Por lo tanto se abre la oportunidad para el desarrollo de una multiplicidad de futuros trabajos, involucrados en la determinación de la expresión de genes específicos, según sea el interés de cada investigación particular (crecimiento, alimentación, reproducción, metabolismo, respuesta inmune, mecanismos moleculares, etc.).

De hecho, la información obtenida aquí fue ya utilizada para caracterizar la expresión génica de las principales enzimas digestivas durante la ontogenia larvaria y juvenil del pez blanco (Rivera-Durán, 2016). Además, al ser uno de los primeros transcriptomas realizados para la familia Atherinopsidae junto con los reportados para los pejerreyes (Hughes *et al.*, 2017) ofrece la oportunidad de realizar comparaciones genómicas evolutivas con los organismos de esta y otras familias de peces o vertebrados.

Finalmente con la información transcriptómica generada en *C. estor* puede realizarse análisis posteriores relacionados con: a) Inserciones, deleciones e inversiones de genes; b) Expresiones regulatorias antisentido; c) Sitios de splicing alternativo; d) Eventos de fusión génica; e) Polimorfismos de nucleótidos de una base (SNP's) y sus frecuencias alélicas; f) Búsqueda de secuencias simples repetidas (Microsatélites); g) Mapeo cromosómico; h) Caracterización de nuevos genes; i) Descripción de rutas metabólicas y procesos biológicos específicos; j) Búsqueda de marcadores moleculares cuantitativos; k) Diseño de microarreglos; l) Ediciones genómicas, entre otros.



### 3.4.3.2. Análisis de anotación, enriquecimiento e identificación de procesos biológicos de transcritos diferencialmente expresados en condiciones de luz continua

La luz ejerce un control directo para sincronizar los ritmos biológicos a nivel fisiológico y molecular en los peces (Mata-Sotres *et al.*, 2015; Carmona-Antoñanzas *et al.*, 2017). En el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*, el tratamiento de luz continua (CL), aplicado desde la fertilización y hasta las 12 SPE, (Semanas post-eclosión) incide directamente sobre la expresión diferencial de 169 transcritos, de los cuales 141, presentan bajos niveles de expresión y solamente 28 transcritos se encuentran con altos niveles en el tratamiento de CL (Figura 35). Bajo el efecto de la luz continua, existe una clara supresión de la expresión en el 83.43% de los transcritos (Tablas 9 y 10, Figuras 37 y 38); así como una alta similitud/correlación de los niveles de expresión entre las muestras (Figura 36 y 39) y los transcritos (Figura 40 y 41).

En larvas de dorada (*Sparus aurata*) estudios de expresión de transcritos de genes circadianos (*bmal1*, *cry1*) reportan valores de baja expresión en condiciones de luz continua, cuando se compara con el fotoperiodo simulado control (Mata-Sotres *et al.*, 2015). Incluso, en un experimento con pulsos de luz de 1 hora en el pez cebra (*D. rerio*) la luz activa los genes circadianos, que funcionan globalmente como represores transcripcionales (Ben-Moshe *et al.*, 2014). Aunado a estas evidencias, en la glándula pineal de rata se observa que la luz también reprime la expresión génica (Fukuhara y Tosini, 2008; Bayle *et al.*, 2009), de manera similar a lo que ocurre en *C. estor*. Debido a estas observaciones se concluye que existe una sincronización directa y una represión mayoritaria de la expresión génica por efecto de la luz continua en *C. estor*, fenómeno que no se observa en las muestras del fotoperiodo simulado control.

Por otro lado, del total de transcritos diferencialmente expresados (169), se identificaron 136 transcritos (80.47%) con anotación funcional precisa (Tablas 12 y 13), 22 transcritos (13.02%) con anotación ambigua (Tabla 14) y 11 transcritos (6.51%) sin anotación (Tabla 15). Esto significa que se desconoce la identidad exacta del 19.53% de los transcritos, por lo que se debe desarrollar futuros trabajos de investigación para determinar la identidad de estos transcritos, que son diferencialmente afectados en sus niveles de expresión por los tratamientos lumínicos aplicados a *C. estor*. Una futura caracterización es importante ya que plantea la posibilidad del descubrimiento de nuevos genes involucrados en la percepción lumínica en peces y vertebrados.

Del total de transcritos con anotación funcional (136) se obtuvo un total de 115 genes/proteínas (Tabla 17), debido a que en algunos transcritos existe una repetición de las anotaciones (Tablas 12 y 13). Por lo tanto, es necesario que en futuros trabajos también se realice una caracterización de los genes (*abca4*, *adcy8*, *col2a1*, *camk1d-like*, *cngb1*, *gucy2F*, *kcnma1*, *lamb3*, *myo7a*,



*opn1sw*, *pcl0*, *plch2*, *scn2a* y *slc43a2*), para determinar si los fenómenos observados se deben a la presencia de múltiples isoformas o corresponden a fragmentos parciales de un mismo gen.

De acuerdo a los análisis de enriquecimiento en términos de GO (Tabla 16), el análisis de interacción de genes/proteínas (Figura 42) y el análisis de rutas metabólicas y procesos biológicos de Kegg (Tablas 18 y 19; Figuras 43, 44 y 45). Se concluye de manera general que el tratamiento de luz continua en *C. estor*, disminuye la expresión de genes relacionados con las actividades de fototransducción, transporte de vesículas sinápticas, metabolismo de purinas, transporte transmembranal iónico, la ruta del ácido tricarbóxico y la de aminoácidos, entre otros procesos.

Cabe mencionar que en estos análisis desarrollados también se detectó una carencia de información importante, ya que en el 41.96% de los genes/proteínas diferencialmente expresados no se pudo determinar su interacción y en el 66.09% de los casos no se determinó la participación en procesos biológicos de Kegg. Estas observaciones plantean que se debe hacer esfuerzos futuros para ampliar la información existente en las bases de datos internacionales. Con la información generada en el presente trabajo pueden plantearse proyectos específicos para disminuir esta brecha y explorar a mayor profundidad las interacciones, así como los procesos biológicos en los que participan los genes afectados por la luz continua en *C. estor*.

Independientemente de la carencia de información en las bases de datos, las evidencias de los análisis en *C. estor*, indican claramente una falta de respuesta ante los estímulos lumínicos a diferentes niveles, lo que sugiere la activación de diversos mecanismos moleculares para protegerse de las condiciones de iluminación constante. Además, este tratamiento incrementa la expresión de genes relacionados con la alimentación, proliferación celular, regulación del sistema inmune y de respuesta a condiciones de estrés oxidativo. Por lo que estas respuestas biológicas globales, posiblemente permiten el crecimiento y la supervivencia bajo condiciones de iluminación constante.

En otras especies de peces también se ha reportado la modulación de respuestas biológicas similares por efecto de la luz (Tabla 21). De manera general en otros organismos se observan diversas regulaciones metabólicas (purinas, lípidos, aminoácidos, xenobióticos, etc.), regulación de actividades de fototransducción, estrés oxidativo, ritmos circadianos, modulación de la transcripción, proteólisis, mecanismos epigénéticos, apoptóticos y sistema inmune, entre otros (Tabla 21), lo que plantea mecanismos de respuesta similar ante los efectos lumínicos en las diversas especies estudiadas.

En la búsqueda de reportes similares con los cuales discutir los resultados presentados, se observó una carencia de trabajos en la literatura que evalúen las condiciones de luz continua en peces con el enfoque transcriptómico de



RNA-seq (Tabla 21). Solo se encontró un trabajo con aproximaciones similares, en la avispa *Nasonia vitipennis* (Davies y Tauber, 2016). Bajo esta premisa el transcriptoma de *C. estor*, es el primer trabajo que demuestra los efectos globales del uso de luz continua en un pez teleósteo, lo que abre la oportunidad para desarrollar trabajos en esta temática que permitan entender a mayor profundidad los efectos de la luz sobre la regulación transcriptómica en teleósteos.

**Tabla 21.** Procesos biológicos relacionados con el transcriptoma de *C. estor* y diferencialmente reguladas por el efecto de la luz en peces.

Procesos biológicos relacionados con el transcriptoma de <i>C. estor</i> y diferencialmente regulados por el efecto de la luz en peces						
No	Especie	Principales procesos biológicos afectados	Muestreo / Tratamiento	Tejidos	Método	Referencia
1	<i>C. estor</i>	Fototransducción, vesículas sinápticas, metabolismo de purinas, procesos homeostáticos de desarrollo celular, anatómico y nervioso, desarrollo retinal y de fotorreceptores, sistema neurológico, diferenciación neuronal, transporte de iones, calcio, sodio, aminoácidos y ácido carboxílico, ritmos circadianos, estrés oxidativo, metabolismo central, crecimiento, sistema inmune	Fase diurna (12L:12D; 24L:0D)	Cabeza completa	RNA-seq	Presente trabajo
2	<i>Danio rerio</i>	Metabolismo central, de purinas, pirimidinas, de nicotinatos y nicotinamidas, tirosina, xenobioticos, ciclo celular, desarrollo ocular, síntesis de pigmentos, degradación de ácidos grasos	Fase diurna vs Fase oscura (14L:10D)	Embriones y cerebro	RNA-seq, Microarreglo, Metabolómica	Li <i>et al.</i> , 2015a
3	<i>Danio rerio</i>	Ritmos circadianos, sinapsis, estrés oxidativo, crecimiento, transporte transmembranal, metabolismo de lípidos	Exposición a pulsos de luz (1hr)	Pineal	RNA-seq	Ben-Moshe <i>et al.</i> , 2014
4	<i>Danio rerio</i>	Metabolismo central, procesos sinápticos, metabolismo de lípidos, estrés oxidativo, inmunoregulación	Fase diurna 24L:0D por 2 días	Cerebro	Proteómica	Purushothaman <i>et al.</i> , 2015
5	<i>Sparus aurata</i>	Ritmos circadianos, fototransducción, reparación de DNA, metabolismo central, de tiroideos, de retinol, de lípidos, de aminoácidos, de vitaminas y minerales, de ácidos nucleicos, crecimiento, apoptosis, ubiquitinación de proteínas	Fase diurna vs Fase oscura (12L:12D)	Larva completa	Microarreglo, qRT-PCR	Yufera <i>et al.</i> , 2017
6	<i>Danio rerio</i>	Ritmos circadianos	Fase diurna vs Fase oscura (14L:10D)	Hígado	Microarreglo	Boyle <i>et al.</i> , 2017
7	<i>Danio rerio</i>	Metabolismo de purinas, xenobioticos, biogénesis de ribosomas, lisozomas, proteosomas, fosforilación oxidativa, actividad RNA polimerasa, replicación DNA, proteólisis por ubiquitinas, ritmos circadianos, fototransducción, transporte de amidas	Fase diurna vs Fase oscura (14L:10D)	Larva completa	Microarreglo	Li <i>et al.</i> , 2013
8	<i>Danio rerio</i>	Ritmos circadianos, respuesta a estímulos luminicos, estrés, estrés oxidativo, reparación de DNA, producción energética, metabolismo central, mitocondrial, de grupos hemo, de retinol	Exposición a pulsos de luz (1-3 hr)	Larva completa, células PAC2, células cardiacas	Microarreglo	Weger <i>et al.</i> , 2011
9	<i>Danio rerio</i>	Ritmos circadianos, estrés oxidativo, estrés, reparación de DNA, modulación de transcripción	Fase diurna vs Fase oscura (12L:12D;0L:24D)	Embriones	Microarreglo, qRT-PCR	Gavriouchkina <i>et al.</i> , 2010
10	<i>Danio rerio</i>	Respuesta a estímulos luminicos, fototransducción, apoptosis, metabolismo central, de purinas, de vitaminas, de aminoácidos, de neurotransmisores, de lípidos diferenciación de mioblastos, diferenciación celular, sistema inmune, desarrollo neuronal, apoptosis	Fase diurna vs Fase oscura (14L:10D)	Pineal	Microarreglo	Toyama <i>et al.</i> , 2009
11	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Metabolismo de lípidos, desarrollo sistema nervioso, fosforilación de aminoácidos	Fase diurna, Hembras expuestas a 24L:0D y 8L:16D en ovulación	Huevo	Microarreglo, qRT-PCR	Bonnet <i>et al.</i> , 2007
12	<i>Danio rerio</i>	Ritmos circadianos	Fase diurna (12L:12D)	Hígado	qRT-PCR	Carmona-Antoñanzas <i>et al.</i> , 2017
13	<i>Danio rerio</i>	Ritmos circadianos, síntesis de melatonina	Fase diurna vs Fase oscura (12L:12D; 24L:0D; 0L:24D)	Cerebro y ovario	qRT-PCR	Khan <i>et al.</i> , 2016
14	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Ritmos circadianos, reproducción	Fase diurna vs Fase oscura (9L:15D; 15L:9D; 24L:0D)	Cerebro	qRT-PCR	Martins <i>et al.</i> , 2015
15	<i>Danio rerio</i>	Ritmos circadianos, metabolismo de lípidos, adipogenesis	Fase diurna vs Fase oscura (14L:10D; 24L:0D)	Larva completa	qRT-PCR	Kopp <i>et al.</i> , 2015
16	<i>Gadus Morhua</i>	Estrés oxidativo, sistema inmune	Fase diurna vs Fase oscura (12L:12D; 24L:0D)	Hígado	qRT-PCR	Giannetto <i>et al.</i> , 2014
17	<i>Danio rerio</i>	Ritmos circadianos, crecimiento	Fase diurna vs Fase oscura (12L:12D; 0L:24D)	Músculo	qRT-PCR	Amaral and Johnston, 2012
18	<i>Gadus Morhua</i>	Crecimiento, Metilación del DNA	Fase diurna (Fotoperiodo Natural; 24L:0D)	Músculo	qRT-PCR	Nagasawa <i>et al.</i> , 2012



Con respecto al proceso de regulación de ritmos circadianos en el fotoperiodo de luz continua se observó una baja expresión de 3 genes *adyc8*, *grin2a* y *rorb* (Tabla 18), pero una alta expresión de *tef* (Thyrotroph embryonic factor). En este último en el pez cebrá se reportan bajos niveles de transcripción durante la fase diurna (Carmona-Antoñanzas *et al.*, 2017), al igual que en los organismos de *C. estor* del fotoperiodo simulado control. El gen *tef*, es un factor de transcripción que está involucrado en la reparación del DNA, inhibe procesos antiapoptóticos, regula genes circadianos, activa la transcripción de *Tshb* y es activado por la luz (Gavriouchkina *et al.*, 2010; Weger *et al.*, 2011).

En conjunto estas observaciones indican una posible disrupción circadiana en el tratamiento de CL. Sin embargo, la mayoría de los genes regulatorios conocidos de estos procesos circadianos no se encuentran diferencialmente expresados. En larvas de dorada expuestas a luz continua, desde la fase embrionaria, se reporta que después de 60 días post-eclosión los perfiles de expresión de genes relacionados con ritmos circadianos (*clock*, *bmal1*, *cry1*, *per3*) son similares en ambos fotoperiodos (Mata-Sotres *et al.*, 2015), lo que sugiere una gran plasticidad y adaptación a la luz continua de estos organismos.

En *C. estor* es posible que existan respuestas similares por lo cual no se observan diferencias significativas en la expresión de la mayoría de los genes clásicos relacionados con el control de los ritmos circadianos. Sin embargo, es necesario realizar estudios durante un perfil de 24 horas para determinar si existe una expresión diferencial en los genes vinculados a estos ritmos biológicos en condiciones de luz continua.

Un estudio transcriptómico en la glándula pineal de *D. rerio* indica que existe una incidencia directa de la luz en la regulación negativa de la transcripción y procesos celulares, así como un control sobre los ritmos circadianos, respuesta a estímulos lumínicos y a condiciones de estrés oxidativo, por peróxido de hidrógeno,  $H_2O_2$  (Ben-Moshe *et al.*, 2014). Además, otro estudio con *D. rerio* también demuestra que la luz activa la producción de  $H_2O_2$ , el cual actúa como segundo mensajero y que vincula el proceso de fotorrecepción con las funciones del reloj circadiano. Incluso se observa que la enzima antioxidante Catalasa regula negativamente la transcripción de genes reloj como *cry1a* y *per2* (Hirayama *et al.*, 2007).

En condiciones de iluminación continua en *C. estor* se observa una baja expresión de genes fotorreceptores vinculados con la percepción de luz azul (*opnsw1*, *sws2ab*) (Tabla 17). Estas longitudes de onda también se han relacionado con el incremento de condiciones oxidantes y muerte celular en diferentes modelos animales (Nakanishi-Ueda *et al.*, 2013; Kuse *et al.*, 2014; Nakashima *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2017<sup>a</sup>; Ishii y Rohrer, 2017; Yacout y Gaillard, 2017).



Incluso existe una baja expresión de genes que participan en el metabolismo de producción energética y el consecuente estrés oxidativo (Tabla 17), como la *citrato sintetasa* y *ndufaf3* (Majed *et al.*, 2002; Crumbley *et al.*, 2012; Khan *et al.*, 2012).

También se observa una alta expresión de genes que atenúan la producción energética (*pdk2*, *ucp2*) (Bermejo-Nogales *et al.*, 2014; Fang *et al.*, 2014; Kuang *et al.*, 2016). En particular *ucp2* aumenta la oxidación de ácidos grasos/glutamina en la mitocondria sobre el sustrato de glucosa. Además, inhibe la actividad inmune de macrófagos, la proliferación de linfocitos T y B (Emre y Nübel, 2010), participa en la activación de las neuronas NPY/AgRP que promueven la respuesta orexigénica y el consumo de alimento (Andrews *et al.*, 2008; Toda y Diano, 2014; Nasrallah y Horvath, 2014; Drougard *et al.*, 2015) y aumenta la supervivencia de células neuronales y retínales ganglionares al disminuir la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Horvath *et al.*, 2003; Barnstable *et al.*, 2016; Hass y Barnstable, 2016).

De la misma manera, se observa la activación de genes vinculados directamente con la respuesta a estrés oxidativo como *aqp3* y *hist1h1b*, que están involucrados en el crecimiento celular (Miller *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012; Galan-Cobo *et al.*, 2015; Hara-Chikuma *et al.*, 2016; Hou *et al.*, 2016). Otro gen con altos niveles de expresión en luz continua es *cyp2k*, el cual se encuentra relacionado con procesos de reparación de lípidos peroxidados y metabolismo de xenobióticos (Zhu *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2013; Saad *et al.*, 2016; Siegenthaler *et al.*, 2017).

Al parecer los organismos mantenidos en estas condiciones lumínicas suprimen la transcripción de algunos genes (*opnsw1*, *sws2ab*, *ndufaf3*, *cittrato sintetasa*) y activan otros (*pdk2*, *ucp2*, *cyp2k*) para disminuir los daños y la producción de ROS. Al mismo tiempo estas condiciones oxidantes promueven la transcripción de genes relacionados con el crecimiento (*aqp3*, *hist1hb1*). En conjunto las evidencias permiten concluir que en el fotoperiodo de luz continua, existen condiciones de estrés oxidativo que regulan el crecimiento, la supervivencia, la alimentación, la expresión de genes relacionados con el control de la producción de ROS y de reparación lipídica.

Adicionalmente estas observaciones permiten proponer la hipótesis de cambios cíclicos ultradianos, del estado general redox y de la transcripción génica en los peces mantenidos bajo iluminación continua. Posiblemente los ciclos ultradianos, son los responsables del crecimiento y supervivencia de los organismos mantenidos en condiciones de luz constante, similar a lo que se observa en especies que viven bajo ambientes arrítmicos (Davies y Tauber, 2016; Beale *et al.*, 2016). Por lo que se requiere de estudios posteriores para describir los posibles cambios ultradianos bajo condiciones arrítmicas de iluminación continua en *C. estor*.



Otro gen vinculado con el crecimiento y que presenta alta expresión en luz continua es el receptor del factor de crecimiento (*egfr*), el cual es inducido por *aqp3* (Miller *et al.*, 2010; Hara-Chikuma *et al.*, 2016). Como es bien conocido *egfr* presenta funciones muy estrechas en relación al control del crecimiento de vertebrados (Kramer *et al.*, 2001; Richter *et al.*, 2014). En mamíferos, *egfr* actúa como un neuropéptido que suprime la locomoción durante la fase nocturna en respuesta a señales circadianas (Richter *et al.*, 2014). En peces no se ha reportado esta función. Sin embargo, como se observa en mamíferos, *egfr* podría cumplir funciones en la regulación de los ciclos circadianos y la locomoción en peces.

Según los resultados transcriptómicos en *C. estor*, la luz continua incrementa la expresión de otros genes relacionados con el crecimiento (*klf5*, *slc43a2*, *hgs*, *ctgf*, *col2a1*, *lamb3* y *sparcl1*) (Tabla 17). De acuerdo al análisis de interacción (Figura 42) el factor de transcripción *klf5* podría ser un actor clave para dirigir las actividades de crecimiento en *C. estor*, ya que es un potente regulador positivo de la proliferación celular en tejidos de mamíferos (Li *et al.*, 2015<sup>b</sup>; Zhao *et al.*, 2015; Nandan *et al.*, 2015) responde a condiciones de estrés oxidativo (Chen *et al.*, 2014) y participa en el desarrollo de linfocitos T (Yang *et al.*, 2003; Cao *et al.*, 2010). Aunque se carece de estudios en modelos de peces, la secuencia de este gen está altamente conservada entre vertebrados, lo que sugiere funciones biológicas similares entre las especies (Zhao *et al.*, 2015).

El gen *slc43a2* es un actor clave del transporte transmembranal de aminoácidos neutrales especialmente de leucina y se encuentra estrechamente vinculado con la proliferación celular en vertebrados (Bodoy *et al.*, 2005; Guetg *et al.*, 2015; Wang y Holst, 2015; Bröer y Bröer, 2017), así como en la activación de linfocitos T (Ananieva *et al.*, 2016). Por su parte el gen *hgs* esta relacionado con la morfogénesis ósea en ratones (Miura y Mishina, 2011), participa en la señalización por endosomas entre rutas que activan la vasculogénesis (Pálfy *et al.*, 2012) y está vinculada con la activación del sistema inmune ante agentes virales en ratón (Luo *et al.*, 2017).

El gen *ctgf* está relacionado con la proliferación de células madre mesenquimales (Battula *et al.*, 2013) que se diferencian en osteocitos, condrocitos, adipocitos, hemocitoblastos, mastocitos y fibroblastos (Waskitani *et al.*, 2007). También está vinculado con la producción de la matriz extracelular, la diferenciación, proliferación y reparación celular, así como en la modulación de procesos inflamatorios (Ivkovic *et al.*, 2003; Luft, 2008; Kular *et al.*, 2011; Mokalled *et al.*, 2016). Adicionalmente los genes *col2a1*, *lamb3* y *sparcl1* se encuentran relacionados con la proliferación celular, el desarrollo de la matriz extracelular y el crecimiento de los tejidos de peces (Rotllant *et al.*, 2008; Wargelius *et al.*, 2009; Dale y Topczewski, 2011; Bertrand *et al.*, 2013; Ryll *et al.*, 2014; Jessen, 2015).



Cuando se compara la expresión de *col2a1* en salmones (*S. salar*) cultivados en condiciones de luz continua contra organismos en condiciones naturales no se observa un cambio significativo en sus niveles de expresión. Sin embargo, se propone como un marcador molecular del crecimiento óseo (Wargelius *et al.*, 2009) al igual que *sparcl1* (Bertrand *et al.*, 2013; Ryll *et al.*, 2014). Además, *col2a1* interviene directamente en la diferenciación de condrocitos (Wang *et al.*, 2014) y responde ante la presencia de ROS (Kim *et al.*, 2010).

En conclusión la alta expresión de los genes *egfr*, *klf5*, *slc43a2*, *hgs*, *ctgf*, *col2a1*, *lamb3* y *sparcl1* en *C. estor* indican una señalización general de crecimiento, producción de células madre mesenquimales, desarrollo de la matriz extracelular, de los tejidos óseo, cartilaginoso y vascular así como una posible activación del sistema inmune en los organismos mantenidos bajo condiciones de luz continua. Debido a que no existen reportes en la literatura del efecto de la luz sobre la expresión de la mayoría de los genes anteriormente mencionados, es necesario desarrollar futuros trabajos para conocer las oscilaciones diarias de expresión bajo el efecto de luz continua y así explicar con mayor detalle los pulsos de crecimiento de *C. estor* mantenidos bajo estas condiciones fotoperiódicas.

En los organismos sometidos a luz continua también se encuentran genes de alta expresión poco caracterizados en vertebrados, que se relacionan con la supervivencia y viabilidad celular como *lactb2* y *ankrd9* (Tabla 17). En estudios recientes se reporta que el gen *lactb2* presenta funciones de endoribonucleasa, sobre las bases (Guanina/Uracilo) de los transcritos mitocondriales (ssRNA) en células humanas y es primordial para el metabolismo de los ácidos nucleicos, así como para el buen funcionamiento de la mitocondria (Levy *et al.*, 2016; Bruni *et al.*, 2017). Aunque se desconocen otras funciones, las evidencias sugieren que existe una sobreactivación de la endoribonucleasa, probablemente debido a una alta actividad transcripcional en las mitocondrias de los organismos bajo condiciones de iluminación continua.

En células cardíacas del pez cebra (*D. rerio*) se reporta una baja expresión del gen *ankrd9* bajo condiciones de estrés e hipoxia (Marques *et al.*, 2008; Sallin y Jazwińska, 2016) y una alta expresión en embriones bajo un tratamiento con estradiol (Hao *et al.*, 2013). En el pollo condiciones de oxidación lipídica incrementan la expresión de *ankrd9* y su expresión se reduce en presencia de apoptosis, por lo que al parecer está vinculado con la peroxidación lipídica y la supervivencia celular (Wang *et al.*, 2009). En células HeLa se observó que ANKRD9 cumple funciones de mantenimiento del tamaño celular y de la integridad de la red trans (exportación de vesículas secretoras) del aparato de Golgi, así como de la integridad post-traducciona de la proteína ATP7A involucrada en el transporte de Cobre (Malinouski *et al.*, 2014).

Esta evidencias en conjunto sugieren que *ankrd9* bajo condiciones de iluminación continua en *C. estor* podría estar vinculado con funciones de respuesta ante estrés oxidativo; ya que su alta expresión esta relacionada con



la oxidación lípidica y el transporte de Cobre, que es un elemento traza indispensable para el buen funcionamiento de enzimas antioxidantes como Sod1, Sod3 y las metalotieninas (Buzadžić *et al.*, 2002; Stern *et al.*, 2007; Felisola *et al.*, 2014; Ogórek *et al.*, 2017). Sin embargo, se requiere de una mayor caracterización de las funciones de este gen en estudios posteriores para apoyar esta hipótesis en *C. estor*.

Los genes *gimap4*, *prss57* y *fcgbp* también presentan altos niveles de transcripción bajo condiciones de luz continua y se encuentran involucrados con la regulación del sistema inmune en vertebrados. Específicamente el gen *gimap4* presenta actividad GTPasa, participa en la diferenciación de linfocitos Th CD4<sup>+</sup>, regula la secreción de citoquinas e interferon- $\gamma$  en la región trans del aparato de Golgi, además se encuentra vinculado con la proliferación, desarrollo y supervivencia de linfocitos T y B (Heinonen *et al.*, 2015<sup>a,b</sup>). El gen *prss57*, es una secuencia de reciente descubrimiento (Perera *et al.*, 2012; Perera *et al.*, 2013) y sus funciones específicas aun no han sido descritas. Sin embargo, se ha sugerido que regula la respuesta de neutrófilos y reacciones del sistema inmune innato en vertebrados (Akula *et al.*, 2015; Kasperkiewicz *et al.*, 2015).

El gen *fcgbp*, es un componente del sistema inmune innato, aunque se desconocen sus funciones exactas, se sabe que está involucrado en la formación de la mucosa epitelial contra patógenos en vertebrados (Birchenough *et al.*, 2015; Lang *et al.*, 2016). En el *Ictalurus spp.* se ha propuesto una posible interacción con la inmunoglobulinas de la mucosa para capturar antígenos bacterianos (Peatman *et al.*, 2015) y genes similares de respuesta inmune se han caracterizado a nivel transcriptómico en la mucosa de *Salmo trutta* (Malachowicz *et al.*, 2017), lo que indica la importancia de la mucosa en la respuesta inmune de los peces.

Con estas evidencias de la alta expresión de *gimap4*, *prss57* y *fcgbp* se puede concluir que existe una activación del sistema inmune a nivel de linfocitos y neutrófilos en los peces blancos expuestos a luz continua. No obstante, estas observaciones deben de completarse con futuros trabajos en el área de inmunidad innata y ritmos circadianos (Lazado *et al.*, 2015; Lazado *et al.*, 2016), que expliquen a mayor profundidad la participación de estos genes y su probable vínculo con las condiciones de estrés oxidativo observadas en *C. estor*.

Por último el gen *natt-3* se encuentra con altos niveles de expresión en luz continua y se sabe que produce una proteína tóxica en peces escorpión. Está relacionada con procesos inflamatorios, de vasodilatación, permeabilidad vascular, activación del sistema inmune y estimulación de terminaciones nerviosas de dolor (Magalhães *et al.*, 2005; Komegae *et al.*, 2011; Lopes-Ferreira *et al.*, 2014; Campos *et al.*, 2016).



Sin embargo, evidencias recientes en peces que no producen esta toxina, indican una posible participación de un gen de la misma familia (*natt-2*) en la respuesta inmune de la mucosa de *Cyclopterus lumpus* (Patel y Brinchmann, 2017), por lo que es necesario desarrollar una caracterización de la expresión de *natt-3*, con el objetivo de conocer sus posibles funciones en la respuesta inmune de la mucosa en *C. estor* y su regulación por efectos del fotoperiodo.

El conjunto de 20 genes que presentan altos valores de expresión en luz continua (*tef*, *pdk2*, *ucp2*, *aqp3*, *hist1h1b*, *cyp2k*, *egfr*, *klf5*, *slc43a2*, *hgs*, *ctgf*, *col2a1*, *lamb3*, *sparcl1*, *lactb2*, *ankrd9*, *prss57*, *gimap4*, *fcgbp* y *natt3*), permiten concluir de manera global que existen condiciones de estrés oxidativo, que modulan la transcripción de genes relacionados con las funciones biológicas de ritmos circadianos, metabolismo central, crecimiento y sistema inmune innato. Sin embargo, aún hay muchos estudios que se requieren, para tener una mayor comprensión de los efectos del fotoperiodo sobre el estrés oxidativo, la regulación de la transcripción genica y su importancia biológica en *C. estor*.

Las múltiples evidencias de los procesos biológicos afectados indican una modulación directa de la luz sobre las actividades relacionadas con la mitocondria. En recientes trabajos se ha propuesto que este orgánulo cumple funciones medulares para el control de los ritmos circadianos, el estrés oxidativo, la producción de cortisol, la alimentación, el sistema inmune, el crecimiento celular, la apoptosis y la regulación epigenética, entre otras funciones (Horvath *et al.*, 2003; Emre y Nübel, 2010; Jou *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Shaughnessy *et al.*, 2014; Calebiro *et al.*, 2014; Tadic *et al.*, 2014; Toda y Diano, 2014; Nasrallah y Horvath *et al.*, 2015; Castegna *et al.*, 2015; Khan *et al.*, 2015; Barnstable *et al.*, 2016; Leone *et al.*, 2017).

Sin embargo, en los peces la relación entre la exposición a diferentes fotoperiodos y la participación de la mitocondria en la regulación de las funciones fisiológicas no se ha explorado ampliamente. Las herramientas moleculares desarrolladas en el presente trabajo ofrecen una aproximación para el desarrollo de futuros trabajos que aborden esta temática y puedan definir cual es la participación de la mitocondria en la regulación de los mecanismos asociados al crecimiento, la alimentación y supervivencia del pez blanco *C. estor*.

Es interesante que para la mayoría de los genes modulados globalmente por el fotoperiodo en *C. estor*, no existen reportes anteriores del efecto de la luz continua sobre su expresión, ya que no son los genes clásicos para los ciclos circadianos, el crecimiento, la activación del sistema inmune y el estrés oxidativo reportados en la literatura. Por lo que se amplía el panorama para desarrollar futuros trabajos sobre los perfiles diarios de estos genes involucrados en una multiplicidad de funciones biológicas que regulan el desarrollo de los peces y probablemente de otros vertebrados.



Además, las similitudes globales de los procesos biológicos afectados en las diversas especies de peces con *C. estor* indican que la luz juega un papel decisivo en el control de los múltiples procesos discutidos. Estas observaciones evidencian un claro efecto de la luz sobre la fisiología de los organismos, que permiten plantear futuros esquemas fotoperiodicos para modular las actividades de crecimiento y alimentación de los peces en cultivo.

Aunado a todo lo descrito anteriormente, la caracterización en futuros trabajos de los 11 transcriptos “nuevos”, los 22 transcriptos ambiguos, las funciones de los genes como *tigd1*, *lactbl1* y *plekhd1* que son regulados directamente por la luz y que actualmente se desconocen sus principales funciones, plantea posibilidades interesantes para el desarrollo de futuros trabajos de investigación que amplíen las fronteras del conocimiento sobre las respuestas biológicas por la modulación del fotoperiodo.

Finalmente, las herramientas moleculares presentadas en este trabajo, aportan información científica de vanguardia, que sin duda potenciará nuevas investigaciones para incrementar el conocimiento de los efectos del fotoperiodo sobre el crecimiento, alimentación y supervivencia, que a su vez servirán de base para el desarrollo de un paquete biotecnológico de cultivo en el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*.

### 3.5. BIBLIOGRAFÍA

- Aedo JE, Maldonado J, Estrada JM, Fuentes EN, Silva H, Gallardo-Escarate C5, Molina A4, Valdés JA (2014) Sequencing and de novo assembly of the red cusk-eel (*Genypterus chilensis*) transcriptome. *Mar Genomics*. 18 Pt B:105-7. doi: 10.1016/j.margen.2014.08.001
- Akula S, Thorpe M, Boinapally V, Hellman L (2015) Granule Associated Serine Proteases of Hematopoietic Cells – An Analysis of Their Appearance and Diversification during Vertebrate Evolution. Lesner A, ed. *PLoS ONE*. 10(11):e0143091. doi:10.1371/journal.pone.0143091
- Alkozi HA, Perez de Lara MJ, Pintor J (2017) Melatonin synthesis in the human ciliary body triggered by TRPV4 activation: Involvement of AANAT phosphorylation. *Exp Eye Res*. 162:1-8. doi: 10.1016/j.exer.2017.06.018
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 215(3):403-10. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Amaral IPG and Johnston IA (2012) Circadian expression of clock and putative clock-controlled genes in skeletal muscle of the zebrafish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 302 (1) R193-R206. doi: 10.1152/ajpregu.00367.2011
- Ananieva EA, Powell JD, Hutson SM (2016) Leucine Metabolism in T Cell Activation: mTOR Signaling and Beyond. *Adv in Nut*. 7(4):798S-805S. doi:10.3945/an.115.011221
- Anders S and Huber W (2010) Differential expression analysis for sequence count data. *Gen Biol*. 11(10):R106. doi:10.1186/gb-2010-11-10-r106
- Andrews ZB, Liu Z-W, Wallingford N, et al. (2008) UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature*. 454(7206):846-851. doi:10.1038/nature07181
- Aragón-Flores E A, Martínez-Cárdenas L, Hernández-González C, Barba-Quintero G, Zavala-Lea OI, Ruiz-Velazco JM, Hernández-Almeida OU, Juárez-López P (2017). Effect of light intensity and photoperiod on growth and survival of the Mexican cichlid, *Cichlasoma beanii* in culture conditions. *Latin Ame J Aqua Res*, 45(2), 293-301. doi:10.3856/vol45-issue2-fulltext-5
- Aride PHR, Roubach R, Nozawa SR, Val AL (2006). Tambaqui growth and survival when exposed to different photoperiods. *Act Amaz*. 36(3), 381-384. doi:10.1590/S0044-59672006000300015
- Ayala MD, Abellán E, Arizcun M et al. (2013) Muscle development and body growth in larvae and early post-larvae of



- shi drum, *Umbrina cirrosa* L., reared under different larval photoperiod: muscle structural and ultrastructural study, *Fish Physiol Biochem* 39: 807. doi:10.1007/s10695-012-9742-x
- Bailey MJ, Coon SL, Carter DA, et al. (2009) Night/Day Changes in Pineal Expression of >600 Genes: central role of adrenergic/camp signaling. *J Biol Chem*. 284(12):7606-7622. doi:10.1074/jbc.M808394200
- Bain PA, Papanicolaou A, Kumar A (2015) Identification of Putative Nuclear Receptors and Steroidogenic Enzymes in Murray-Darling Rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*) Using RNA-Seq and De Novo Transcriptome Assembly. *Craft JA, ed. PLoS ONE*. 2015;10(11):e0142636. doi:10.1371/journal.pone.0142636
- Bairoch A and Apweiler R (2000) The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. *Nucleic Acids Research*. 28(1):45-48
- Baltatzis M, Hatzitolios A, Tziomalos K, Iliadis F, Zamboulis Ch (2008) Neuropeptide Y and alpha-melanocyte-stimulating hormone: interaction in obesity and possible role in the development of hypertension. *Int J Clin Pract*. 62: 1432–1440. doi:10.1111/j.1742-1241.2008.01823.x
- Bapary MAJ, Amin MN, et al. (2011) The stimulatory effects of long wavelengths of light on the ovarian development in the tropical damselfish, *Chrysiptera cyanea*. *Aquaculture* 314(1): 188-192. doi https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.02.006
- Barnstable CJ, Reddy R, Li H, Horvath TL (2016) Mitochondrial Uncoupling Protein 2 (UCP2) regulates retinal ganglion cell number and survival. *J mol neuro*. 58(4):461-469. doi:10.1007/s12031-016-0728-5
- Battaglione SC and Talbot RB (1990) Initial swim bladder inflation in intensively reared Australian bass larvae, *Macquaria novemaculeata* (Steindachner) (Perciformes: Percichthyidae). *Aquaculture* 86(4): 431-442. doi https://doi.org/10.1016/0044-8486(90)90331-G
- Battula VL, Chen Y, Cabreira M da G, et al. (2013) Connective tissue growth factor regulates adipocyte differentiation of mesenchymal stromal cells and facilitates leukemia bone marrow engraftment. *Blood*.122(3):357-366. doi:10.1182/blood-2012-06-437988
- Bayarri MJ, Madrid JA, et al. (2002) Influence of light intensity, spectrum and orientation on sea bass plasma and ocular melatonin. *Journal of pineal research* 32(1): 34-40
- Bayarri MJ, Falcón J, Zanuy S, Carrillo M (2010) Continuous light and melatonin: daily and seasonal variations of brain binding sites and plasma concentration during the first reproductive cycle of sea bass. *Gen Comp Endocrinol*.169(1):58-64. doi: 10.1016/j.ygcen.2010.07.007
- Beale AD, Whitmore D, Moran D. Life in a dark biosphere: a review of circadian physiology in "arrhythmic" environments (2016) *Journal of Comparative Physiology B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*. 186(8):947-968. doi:10.1007/s00360-016-1000-6
- Ben-Moshe Z, Alon S, Mracek P, et al. (2014) The light-induced transcriptome of the zebrafish pineal gland reveals complex regulation of the circadian clockwork by light. *Nucl Acids Res*. 42(6):3750-3767. doi:10.1093/nar/gkt1359
- Bermejo-Nogales A, Calduch-Giner JA, Pérez-Sánchez J (2014) Tissue-specific gene expression and functional regulation of uncoupling protein 2 (UCP2) by hypoxia and nutrient availability in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): implications on the physiological significance of UCP1–3 variants. *Fish Physiol Biochem* 40: 751. doi.org/10.1007/s10695-013-9882-7
- Bertrand S, Fuentealba J, Aze A, et al. (2013) A dynamic history of gene duplications and losses characterizes the evolution of the SPARC family in eumetazoans. *Proc Royal Soc B: Biol Sci*. 280(1757):20122963. doi:10.1098/rspb.2012.2963
- Birchenough GMH, Johansson MEV, Gustafsson JK, Bergström JH, Hansson GC (2015) New developments in goblet cell mucus secretion and function. *Muc Immunol*. 8, 712–719; doi:10.1038/mi.2015.32.
- Biswas A and Takii K (2016) Effects of Light Intensity on the Growth Performance and Stress Response in Striped Knifejaw, (*Oplegnathus fasciatus*). *J World Aqua Soc*. 47: 806–811. doi:10.1111/jwas.12313
- Blanco-Vives B, Villamizar N, Ramos J, Bayarri MJ, Chereguini O, Sanchez Vazquez FJ (2010) Effect of daily thermo and photocycles of different light spectrum on the development of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Aqua*. 306, 137–145. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.05.034
- Bodoy S, Martín L, Zorzano A, Palacín M, Estévez R, Bertran J (2005) Identification of LAT4, a novel amino acid transporter with system L activity. *J Biol Chem*. 280(12):12002-11. doi: 10.1074/jbc.M408638200
- Bonnet E, Fostier A, Bohe J (2007) Microarray-based analysis of fish egg quality after natural or controlled ovulation. *BMC Genomics*. 8:55. doi:10.1186/1471-2164-8-55



- Boyle G, Richter K, Priest HD, Traver D, Mockler TC, Chang JT, et al. (2017) Comparative Analysis of Vertebrate Diurnal/Circadian Transcriptomes. PLoS ONE 12(1): e0169923. doi:10.1371/journal.pone.0169923
- Braasch I and Postlethwait JH (2012) Polyploidy in Fish and the Teleost Genome Duplication. In: Soltis P., Soltis D. (eds) Polyploid and Genome Evolution. Springer, Berlin, Heidelberg, 341-384. doi:10.1007/978-3-642-31442-1\_17
- Brigelius-Flohé R and Flohé L (2011) Basic Principles and Emerging Concepts in the Redox Control of Transcription Factors. Antioxidants & redox signaling 15(8): 2335-2381. doi 10.1089/ars.2010.3534
- Bröer S and Bröer A (2017) Amino acid homeostasis and signalling in mammalian cells and organisms. Biochem J. 474(12):1935-1963. doi:10.1042/BCJ20160822
- Bruni F, Lightowlers RN, Chrzanowska-Lightowlers ZM (2017) Human mitochondrial nucleases. The Febs Journal. 284(12):1767-1777. doi:10.1111/febs.13981
- Brüning A, Hölker F, Franke S, Preuer T, Kloas W (2015) Spotlight on fish: light pollution affects circadian rhythms of European perch but does not cause stress. Sci Total Environ 511:516–522. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.12.094
- Buzadžić B, Korać B, Lazić T, Obradović D (2002) Effect of supplementation with Cu and Zn on antioxidant enzyme activity in the rat tissues. Food Res Int. 35,2–3;217-220. doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00187-9
- Calebiro D, Di Dalmazi G, Bathon K, Ronchi C, Beuschlein F (2015) cAMP signaling in cortisol producing adrenal adenoma. Europ J Endo. 173. doi:10.1530/EJE-15-0353
- Campos FV, Menezes TN, Malacarne PF, et al. (2016) A review on the Scorpaena plumieri fish venom and its bioactive compounds. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 22:35. doi:10.1186/s40409-016-0090-7
- Canosa LF and Peter RE (2005) Pre-pro-somatostatin-III may have cortistatin-like functions in fish. Annals of the New York Academy of Sciences 1040: 253-256. doi 10.1196/annals.1327.036
- Canosa LF, Chang JP, et al. (2007) Neuroendocrine control of growth hormone in fish. General and comparative endocrinology 151(1): 1-26. doi 10.1016/j.ygcen.2006.12.010
- Cañestro C. (2012) Two Rounds of Whole-Genome Duplication: Evidence and Impact on the Evolution of Vertebrate Innovations. In: Soltis P., Soltis D. (eds) Polyploidy and Genome Evolution. Springer, Berlin, Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-642-31442-1\_16
- Cao Z, Sun X, Icli B, Wara AK, Feinberg MW (2010) Role of Krüppel-like factors in leukocyte development, function, and disease. Blood. 116(22):4404-4414. doi:10.1182/blood-2010-05-285353
- Cardinali DP, Vigo DE, Olivar N, Vidal MF, Brusco LI (2014) Melatonin Therapy in Patients with Alzheimer's Disease. Antioxidants. 3(2):245-277. doi:10.3390/antiox3020245
- Carmona-Antoñanzas G, Santi M, Migaud H, Vera LM (2017) Light- and clock-control of genes involved in detoxification, Chronobiol Int. doi:10.1080/07420528.2017.1336172
- Carreras-Sureda A, Pihán P, Hetz C (2017) Calcium signaling at the endoplasmic reticulum: fine-tuning stress responses. Cell Calcium. pii: S0143-4160(17)30093-3. doi: 10.1016/j.ceca.2017.08.004
- Castegna A, Lacobazzi V, Infantino V (2015) The mitochondrial side of epigenetics. Physiol Genomics. 47(8):299-307. doi: 10.1152/physiolgenomics.00096.2014
- Cavallari N, Frigato E, Vallone D, Fröhlich N, López-Olmeda JF, Foà A, Berti R, Sánchez-Vázquez FJ, et al. (2011) A blind circadian clock in cavefish reveals that opsins mediate peripheral clock photoreception. PLoS Biology 9 e1001142. doi:10.1371/journal.pbio.1001142
- Cazaméa-Catalan D, Besseau L, Falcón J, Magnanou E (2014) The timing of Timezyme diversification in vertebrates. PLoS ONE 9 e112380. doi:10.1371/journal.pone.0112380
- Cerdá-Reverter JM, Zanuy S, Carrillo M, Madrid JA (1998) Time-course studies on plasma glucose, insulin, and cortisol in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) held under different photoperiodic regimes. Physiol Behav. 64 245–250. doi:10.1016/s0031-9384(98)00048-1
- Chang JP and Habibi HR (2002) Intracellular integration of multifactorial neuroendocrine regulation of goldfish somatotrope functions. Developments in understanding fish growth Symposium proceedings of the international congress on the biology of fish University of British Columbia, Vancouver. pp. 5-14.
- Chang JP and Wong AOL (2009) Chapter 4 Growth Hormone Regulation in Fish: A Multifactorial Model with Hypothalamic, Peripheral and Local Autocrine/Paracrine Signals. Fish Physiology. Academic Press, pp. 151-195.
- Chatchaiphan S, Srisapoome P, Kim JH, Devlin RH, Na-Nakorn U (2017) De Novo Transcriptome Characterization and



- Growth-Related Gene Expression Profiling of Diploid and Triploid Bighead Catfish (*Clarias macrocephalus* Günther, 1864). *Mar Biotechnol.* 19(1):36-48. doi: 10.1007/s10126-017-9730-3
- Chen H-L, Chong I-W, Lee Y-C, et al. (2014) Krüppel-Like Factor 5 Mediates Proinflammatory Cytokine Expression in Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury through Upregulation of Nuclear Factor- $\kappa$ B Phosphorylation In Vitro and In Vivo. *Med Inflamm.* 2014:281984. doi:10.1155/2014/281984
- Chen QL, Luo Z, Huang C, et al. (2016) De novo characterization of the liver transcriptome of javelin goby *Synechogobius hasta* and analysis of its transcriptomic profile following waterborne copper exposure. *Fish Physiol Biochem.* 42: 979. doi:10.1007/s10695-015-0190-2
- Chen WJ, Wu C, Xu Z, Kuse Y, Hara H, Duh EJ (2017<sup>a</sup>) Nrf2 protects photoreceptor cells from photo-oxidative stress induced by blue light. *Exp Eye Res.* 154;151-158. doi.org/10.1016/j.exer.2016.12.001
- Chen S, Liu Y, Rong X, Li Y, Zhou J, Lu L. (2017<sup>b</sup>) Neuroprotective Role of the PI3 Kinase/Akt Signaling Pathway in Zebrafish. *Front in Endocrinol.* 8:21. doi:10.3389/fendo.2017.00021
- Chi L, Li X, Liu Q, Liu Y (2017) Photoperiod regulate gonad development via kisspeptin/kissr in hypothalamus and saccus vasculosus of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Wolfe A, ed. *PLoS ONE.* 2017;12(2):e0169569. doi:10.1371/journal.pone.0169569
- Choi CY, Shin HS, et al. (2012) Effect of LED light spectra on starvation-induced oxidative stress in the cinnamon clownfish *Amphiprion melanopus*. *Comparative biochemistry and physiology Part A, Molecular & integrative physiology* 163(3-4): 357-363. doi 10.1016/j.cbpa.2012.07.005
- Choi JY, Kim NN, Choi YJ, Park MS, Choi CY (2016) Differential daily rhythms of melatonin in the pineal gland and gut of goldfish *Carassius auratus* in response to light. *Biol Rhyth Res.* 47 145–161. doi:10.1080/09291016.2015.1094964
- Cifuentes R, González J, Montoya G, Jara A, Ortíz N, Piedra P, Habit E (2012) Relación longitud-peso y factor de condición de los peces nativos del río San Pedro (cuenca del río Valdivia, Chile). *Gayana (Concepción)*, 76(Supl. 1), 86-100. doi:10.4067/S0717-65382012000100009
- Conde-Sieira M and Soengas JL (2017) Nutrient Sensing Systems in Fish: Impact on Food Intake Regulation and Energy Homeostasis. *Front. Neurosci.* 10:603. doi: 10.3389/fnins.2016.00603
- Cortés R, Teles M, Oliveira M, Fierro-Castro C, Tort L, Cerdá-Reverter JM (2017) Effects of acute handling stress on short-term central expression of orexigenic/anorexigenic genes in zebrafish. *Fish Physiol Biochem.* doi: 10.1007/s10695-017-0431-7
- Coskun ZM, Sacan O, Karatug A, Turk N, Yanardag R, Bolkent S, Bolkent S (2013) Regulation of oxidative stress and somatostatin, cholecystokinin, apelin gene expressions by ghrelin in stomach of newborn diabetic rats. *Acta Histochem.* 115(7):740-7. doi: 10.1016/j.acthis.2013.03.001
- Cousse E, De Smet P, Bogaert E, Elens I, Van Damme P, Willems P, et al. (2011) G37R SOD1 mutant alters mitochondrial complex I activity, Ca(2+) uptake and ATP production. *Cell Calcium* 49, 217–225. doi: 10.1016/j.ceca.2011.02.004
- Cowan M, Azpeleta C, López-Olmeda JF (2017) Rhythms in the endocrine system of fish: a review. *J Comp Physiol B.* doi: 10.1007/s00360-017-1094-5
- Crumbley C, Wang Y, Banerjee S, Burris TP (2012) Regulation of Expression of Citrate Synthase by the Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Receptor  $\alpha$  (ROR $\alpha$ ). Cooney AJ, ed. *PLoS ONE.* 7(4):e33804. doi:10.1371/journal.pone.0033804
- Da Silveira Cruz-Machado S, Tamura EK, et al. (2017) Daily corticosterone rhythm modulates pineal function through NF $\kappa$ B-related gene transcriptional program. *Sci Rep.* 7:2091. doi:10.1038/s41598-017-02286-y.
- Dale RM, Topczewski J (2011) Identification of an evolutionarily conserved regulatory element of the zebrafish *col2a1a* gene. *Developmental biology.* 357(2):518-531. doi:10.1016/j.ydbio.2011.06.020
- David SS, O'Shea VL, et al. (2007) Base Excision Repair of Oxidative DNA Damage. *Nature* 447(7147): 941-950. doi 10.1038/nature05978
- Davies NJ, Tauber E (2016) Deep sequencing analysis of the circadian transcriptome of the jewel wasp *Nasonia vitripennis*. *bioRxiv* 048736. doi: 10.1101/048736
- Dehal P and Boore JL (2005) Two Rounds of Whole Genome Duplication in the Ancestral Vertebrate. Holland P, ed. *PLoS Biol.* 3(10):e314. doi:10.1371/journal.pbio.0030314
- Delgado MJ, Cerdá-Reverter JM, Soengas JL (2017) Hypothalamic Integration of Metabolic, Endocrine, and Circadian Signals in Fish: Involvement in the Control of Food Intake. *Frontiers in Neuroscience.* 2017;11:354.



doi:10.3389/fnins.2017.00354

- De Pedro N, Delgado MJ, Pinillos ML, Alonso-Gómez AL, Alonso-Bedate M (1998) Daily rhythms in NAT activity, cortisol, glucose, glycogen and catecholamines in tench (*Tinca tinca* (L.)). *Polish Arch Hydrobiol* 45 321–329.
- Dibner C, Schibler U, Albrecht U (2010) The Mammalian Circadian Timing System: Organization and Coordination of Central and Peripheral Clocks. *Ann Rev Physiol*. 72 (1): 517–549. doi:10.1146/annurev-physiol-021909-135821
- Dillies MA, Rau A, Aubert J, Hennequet-Antier C, Jeanmougin M, Servant N, Keime C, Marot G, Castel D, Estelle J, Guernec G, Jagla B, Jouneau L, Laloë D, Le Gall C, Schaëffer B, Le Crom S, Guedj M, Jaffrézic F; French StatOmique Consortium (2013) A comprehensive evaluation of normalization methods for Illumina high-throughput RNA sequencing data analysis. *Brief Bioinform*. 14 (6): 671-683. doi: 10.1093/bib/bbs046
- Dubocovich ML, Delagrange P, Krause DN, Sugden D, Cardinali DP, Olcese J (2010) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, Classification, and Pharmacology of G Protein-Coupled Melatonin Receptors. *Pharmacol Rev*. 62 (3) 343-380. doi: 10.1124/pr.110.002832
- Dudás (2013). *The Human Hypothalamus: Anatomy, Functions and Disorders*. New York: Nova Science Publishers. ISBN 978-1-62081-806-0
- Dudek J, Benedix J, Cappel S, Greiner M, Jalal C, Muller L, et al. (2009) Functions and pathologies of BiP and its interaction partners. *Cell Mol. Life Sci*. 66, 1556–1569. doi: 10.1007/s00018-009-8745-y
- Dufey E, Sepúlveda D, Rojas-Rivera D, Hetz C (2014) Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. 1. An overview. *Am J Physiol Cell Physiol*. 307(7):C582-94. doi: 10.1152/ajpcell.00258.2014
- Drougard A, Fournel A, Valet P and Knauf C (2015) Impact of hypothalamic reactive oxygen species in the regulation of energy metabolism and food intake. *Front. Neurosci*. 9:56. doi: 10.3389/fnins.2015.00056
- Ebbesson LOE, Björnsson BT, Ekström P, Stefansson SO (2008) Daily endocrine profiles in parr and smolt in Atlantic salmon. *Comp Biochem Physiol: Part A Mol Integ Physiol*. 151 698–704. doi:10.1016/j.cbpa.2008.08.017
- Einarsdottir IE, Sakata S, et al. (2002) Atlantic halibut growth hormone: structure and plasma levels of sexually mature males and females during photoperiod-regulated annual cycles. *General and comparative endocrinology* 127(1): 94-104
- Ellis T, Yildiz HY, López-Olmeda J, Spedicato MT, Tort L, Øverli Ø & Martins C (2012) Cortisol and finfish welfare. *Fish Physiol Biochem*. 38 163–188. doi:10.1007/s10695-011-9568-y
- Emet M, Ozcan H, Ozel L, Yayla M, Halici Z, Hacimuftuoglu A (2016) A Review of Melatonin, Its Receptors and Drugs. *Eurasian J Medic*. 48(2):135-141. doi:10.5152/eurasianjmed.2015.0267
- Emre Y and Nübel T (2010) Uncoupling protein UCP2: When mitochondrial activity meets immunity. *FEBS Lett*. 584,8,1437-1442. doi:10.1016/j.febslet.2010.03.014
- Espigares F, Rocha A, Gómez A, Carrillo M, Zanuy S (2017) Photoperiod modulates the reproductive axis of European sea bass through regulation of kiss1 and gnRH2 neuronal expression. *Gen Comp Endocrinol*. 240:35-45. doi: 10.1016/j.ygcen.2016.09.007
- Falahatkar B, Poursaeid S, Efatpanah I, Meknatkhah B, Biswas A (2012) Effect of Photoperiod Manipulation on Growth Performance, Physiological and Hematological Indices in Juvenile Persian Sturgeon, *Acipenser persicus*. *J World Aqua Soc*. 43: 679–687. doi:10.1111/j.1749-7345.2012.00600.x
- Falcon J, Besseau L, et al. (2003) Melatonin modulates secretion of growth hormone and prolactin by trout pituitary glands and cells in culture. *Endocrinology* 144(10): 4648-4658. doi 10.1210/en.2003-0707
- Falcón J, Migaud H, Muñoz-Cueto JA & Carrillo M (2010) Current knowledge on the melatonin system in teleost fish. *Gen Comp Endo*. 165 469–482. doi:10.1016/j.ygcen.2009.04.026
- Fang DA, Zhou YF, Duan JR, Zhang MY, Xu DP, Liu K, Xu P, Wei Q (2015) Screening potential SSR markers of the anadromous fish *Coilia nasus* by de novo transcriptome analysis using Illumina sequencing. *Genet Mol Res*. 14(4):14181-8. doi: 10.4238/2015.November.13.1
- Felizola SJA, Nakamura Y, Arata Y, et al. (2014) Metallothionein-3 (MT-3) in the Human Adrenal Cortex and its Disorders. *Endocr Pathol* 25: 229. doi.10.1007/s12022-013-9280-9
- Feng NY and Bass AH (2016) "Singing" Fish Rely on Circadian Rhythm and Melatonin for the Timing of Nocturnal Courtship Vocalization. *Curr Biol*. 26(19):2681-2689. doi: 10.1016/j.cub.2016.07.079
- Fernandes PA1, Tamura EK, D'Argenio-Garcia L, Muxel SM, da Silveira Cruz-Machado S, et al. (2017) Dual Effect of Catecholamines and Corticosterone Crosstalk on Pineal Gland Melatonin Synthesis. *Neuroendocrinology*. 104(2):126-



134. doi: 10.1159/000445189

- Finn RD, Clements J, Eddy SR (2011) HMMER web server: interactive sequence similarity searching. Nucl Acid Res. 239(Web Server issue):W29-W37. doi:10.1093/nar/gkr367
- FishBase (2016). World Wide Web Electronic Publication, eds R. Froese and D. Pauly. Available online at: <http://www.fishbase.org>, version (10/2016)
- Forster SC, Finkel AM, Gould JA, Hertzog PJ (2013) RNA-eXpress annotates novel transcript features in RNA-seq data. Bioinformatics. 29(6):810-812. doi:10.1093/bioinformatics/btt034
- Freitas LS, Rodrigues RV, Okamoto MH, Louzada LR, Sampaio LA (2009) Effects of photoperiod on survival and growth of the marine pejerrey *Odontesthes argentinensis* larvae. Aquaculture Research, 40: 252–255. doi:10.1111/j.1365-2109.2008.02080.x
- Froese R (2006) Cube law, condition factor and weight-length relationships: history, meta-analysis and recommendations. J Appl Ichthy 22:241-253. doi: 10.1111/j.1439-0426.2006.00805.x
- Fuentes E, Valdés JA, et al. (2013) Regulation of skeletal muscle growth in fish by the Growth Hormone - Insulin-like Growth Factor system.
- Fukuhara C, Tosini G (2008) Analysis of daily and circadian gene expression in the rat pineal gland. Neurosci res.60(2):192-198. doi:10.1016/j.neures.2007.10.011
- Fulda S, Gorman AM, Hori O, Samali A (2010) "Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death," Int J Cell Biol. 214074, 23. doi:10.1155/2010/214074
- Galán-Cobo A, Ramírez-Lorca R, Serna A, Echevarría M (2015) Overexpression of AQP3 Modifies the Cell Cycle and the Proliferation Rate of Mammalian Cells in Culture. Alvarez de la Rosa D, ed. PLoS ONE.10(9):e0137692. doi:10.1371/journal.pone.0137692
- García LE and Meier AH (1973) Daily rhythms in concentration of plasma cortisol in male and female Gulf Killifish, *Fundulus grandis*. Biol Bull. 144 471–479. doi:10.2307/1540301
- Garcia-Galiano D, Navarro VM, et al. (2010) The anorexigenic neuropeptide, nesfatin-1, is indispensable for normal puberty onset in the female rat. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 30(23): 7783-7792. doi 10.1523/jneurosci.5828-09.2010
- Garcia-Galiano D, Pineda R, et al. (2012) Cellular distribution, regulated expression, and functional role of the anorexigenic peptide, NUCB2/nesfatin-1, in the testis. Endocrinology 153(4): 1959-1971. doi 10.1210/en.2011-2032
- Gavriouchkina D, Fischer S, Ivacevic T, Stolte J, Benes V, et al. (2010) Thyrotroph Embryonic Factor Regulates Light-Induced Transcription of Repair Genes in Zebrafish Embryonic Cells. PLoS ONE 5(9): e12542. doi:10.1371/journal.pone.0012542
- Ghomi MR, Zarei M, Sohrabnejad M (2011) Effect of photoperiod on growth and feed conversion of juvenile wild carp, *Cyprinus carpio*. Acta Biol Hung. 62(2):215-8. doi: 10.1556/ABiol.62.2011.2.12
- Giannecchini LG, Massago H, Fernandes, JBK (2012) Effects of photoperiod on reproduction of Siamese fighting fish *Betta splendens*. R. Bras. Zootec. 41,4; 821-826. doi.org/10.1590/S1516-35982012000400001
- Giannetto A, Fernandes JMO, Nagasawa K, Mauceri A, Maisano M, De Domenico E, Cappello T, Oliva S, Fasulo S (2014) Influence of continuous light treatment on expression of stress biomarkers in Atlantic cod. Dev Comp Immuno. 44 (2014) 30–34. doi:10.1016/j.dci.2013.11.011
- Glasauer SM and Neuhauss SC (2014) Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences. Mol Genet Genomics. 289(6):1045-60. doi: 10.1007/s00438-014-0889-2
- Gonzalez R, Kerbel B, et al. (2010) Molecular, cellular and physiological evidences for the anorexigenic actions of nesfatin-1 in goldfish. PLoS one 5(12): e15201. doi 10.1371/journal.pone.0015201
- Gonzalez R, Shepperd E, et al. (2012) Nesfatin-1 regulates the hypothalamo-pituitary-ovarian axis of fish. Biology of reproduction 87(4): 84. doi 10.1095/biolreprod.112.099630
- Gorissen M, Flik G, et al. (2006) Peptides and proteins regulating food intake: a comparative view. Animal Biology 56(4): 447-473. doi doi:https://doi.org/10.1163/157075606778967829
- Gortan Cappellari G, Semolic A, Ruozzi G, Vinci P, Guarnieri G, Bortolotti F, Barbetta D, Zanetti M, Giacca M, Barazzoni R (2017) Unacylated ghrelin normalizes skeletal muscle oxidative stress and prevents muscle catabolism by enhancing tissue mitophagy in experimental chronic kidney disease. FASEB J. pii: fj.201700126R. doi: 10.1096/fj.201700126R



- Gottschalk PG and Dunn JR (2005) Measuring parallelism, linearity, and relative potency in bioassay and immunoassay data. *J Biopharm Stat.* 15(3):437-63. doi: 10.1081/BIP-200056532
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, et al. (2011) Trinity: Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat biotech.* 29(7):644-652. doi:10.1038/nbt.1883
- Guetg A, Mariotta L, Bock L, et al. (2015) Essential amino acid transporter Lat4 (Slc43a2) is required for mouse development. *J Physiol.* ;593(Pt 5):1273-1289. doi:10.1113/jphysiol.2014.283960
- Green DR and Llambi F1 (2015) Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 7(12). pii: a006080. doi: 10.1101/cshperspect.a006080
- Grootjans J, Kaser A, Kaufman RJ, Blumberg RS (2016) The unfolded protein response in immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 16(8):469-84. doi: 10.1038/nri.2016.62
- Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M, et al. (2013) De novo transcript sequence reconstruction from RNA-Seq: reference generation and analysis with Trinity. *Nat prot.*8(8):10.1038/nprot.2013.084. doi:10.1038/nprot.2013.084
- Hass DT and Barnstable CJ (2016) Uncoupling protein 2 in the glial response to stress: implications for neuroprotection. *Neural Reg Res.* 11(8):1197-1200. doi:10.4103/1673-5374.189159
- Handeland SO, Imsland AK, Björnsson BT, Stefansson SO (2013) Long-term effects of photoperiod, temperature and their interaction on growth, gill Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity, seawater tolerance and plasma growth-hormone levels in Atlantic salmon *Salmo salar*. *J Fish Biol.* 83(5):1197-209. doi: 10.1111/jfb.12215
- Hao R, Bondesson M, Singh AV, et al. (2013) Identification of Estrogen Target Genes during Zebrafish Embryonic Development through Transcriptomic Analysis. *Gong Z, ed. PLoS ONE.* 8(11):e79020. doi:10.1371/journal.pone.0079020
- Hara-Chikuma M, Watanabe S, Satooka H (2016) Involvement of aquaporin-3 in epidermal growth factor receptor signaling via hydrogen peroxide transport in cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 18;471(4):603-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.02.010
- He YY, Huang JL, Chignell CF (2004) Delayed and sustained activation of extracellular signal-regulated kinase in human keratinocytes by UVA: implications in carcinogenesis. *J Biol Chem.* 279(51):53867-74. doi: 10.1074/jbc.M405781200
- He Y-Y, Council SE, Feng L, Chignell CF (2008) UVA-induced cell cycle progression is mediated by ADAM/EGFR/AKT/Cyclin D1 pathways in keratinocytes. *Cancer Res.* 68(10):3752-3758. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6138
- Head AB and Malison JA (2000) Effects of Lighting Spectrum and Disturbance Level on the Growth and Stress Responses of Yellow Perch *Perca flavescens*. *Journal of the World Aquaculture Society* 31(1): 73-80. doi 10.1111/j.1749-7345.2000.tb00700.x
- Heinonen MT, Kanduri K, Lähdesmäki HJ, Lahesmaa R, Henttinen TA (2015a) Tubulin- and actin-associating GIMAP4 is required for IFN- $\gamma$  secretion during Th cell differentiation. *Immun Cell Biol.* 93(2):158-166. doi:10.1038/icb.2014.86
- Heinonen MT, Laine A-P, Söderhäll C, et al. (2015b) GIMAP GTPase Family Genes: Potential Modifiers in Autoimmune Diabetes, Asthma, and Allergy. *J Immunol.* A194(12):5885-5894. doi:10.4049/jimmunol.1500016
- Hernandez-Perez J, Miguez JM, et al. (2015) Daily rhythms in activity and mRNA abundance of enzymes involved in glucose and lipid metabolism in liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Influence of light and food availability. *Chronobiology international* 32(10): 1391-1408. doi 10.3109/07420528.2015.1100633
- Hirayama J, Cho S, Sassone-Corsi P (2007) Circadian control by the reduction/oxidation pathway: catalase represses light-dependent clock gene expression in the zebrafish. *Proc. Natl Acad. Sci. USA,* 104, 15747–15752. doi: 10.1073/pnas.0705614104
- Horvath TL, Diano S, Barnstable CJ (2003) Mitochondrial uncoupling protein 2 in the central nervous system: neuromodulator and neuroprotector. *Biochem Pharmacol.* 2003a;65:1917–1921. PMID: 12787871
- Hou SY, Li YP, Wang JH, Yang SL, Wang Y, Wang Y, Kuang Y (2016) Aquaporin-3 Inhibition Reduces the Growth of NSCLC Cells Induced by Hypoxia. *Cell Physiol Biochem.* 38(1):129-40. doi: 10.1159/000438615
- Huang TS, Ruoff P, Fjellidal PG (2010) Effect of continuous light on daily levels of plasma melatonin and cortisol and expression of clock genes in pineal gland, brain, and liver in atlantic salmon postsmolts. *Chronobiol Int.* 27(9-10):1715-34. doi: 10.3109/07420528.2010.521272
- Hughes LC, Somoza GM, Nguyen BN, et al. (2017) Transcriptomic differentiation underlying marine-to-freshwater



- transitions in the South American silversides *Odontesthes argentinensis* and *O. bonariensis* (Atheriniformes). *Ecology and Evolution*. 7(14):5258-5268. doi:10.1002/ece3.3133
- Hull KL and Harvey S (2002) GH as a co-gonadotropin: the relevance of correlative changes in GH secretion and reproductive state. *The Journal of endocrinology* 172(1): 1-19
- Husse J, Eichele G, Oster H (2015) Synchronization of the mammalian circadian timing system: Light can control peripheral clocks independently of the SCN clock: Alternate routes of entrainment optimize the alignment of the body's circadian clock network with external time. *Bioessays*. 37(10):1119-1128. doi:10.1002/bies.201500026
- Imsland AK, Gunnarsson S, Roth B, Foss A, Le Deuff S, Norberg B, Thorarensen H, Helming T (2013) Long-term effect of photoperiod manipulation on growth, maturation and flesh quality in turbot. *Aqua*. 416-417:152-160. doi:10.1016/j.aquaculture.2013.09.005
- Inoue J, Sato Y, Sinclair R, Tsukamoto K, Nishida M (2015) Rapid genome reshaping by multiple-gene loss after whole-genome duplication in teleost fish suggested by mathematical modeling. *PNAS*. 112(48):14918-14923. doi:10.1073/pnas.1507669112
- Ishii M and Rohrer B. (2017) Bystander Effects elicited by single-cell photo-oxidative blue-light stimulation in retinal pigment epithelium cell networks. *Cell Death Discovery*. 2017;3:16071. doi:10.1038/cddiscovery.2016.71
- Isorna E, de Pedro N, et al. (2017) Interplay between the endocrine and circadian systems in fishes. *The Journal of endocrinology* 232(3): R141-r159. doi 10.1530/joe-16-0330
- Ivkovic S, Yoon BS, Popoff SN, et al. (2003) Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development. *Dev*. 30(12):2779-2791. PMID: PMC3360973
- Jessen JR (2015) Recent advances in the study of zebrafish extracellular matrix proteins. *Dev Biol*. 401(1):110-21. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.12.022
- Johnsson JI and Björnsson BT (1994) Growth hormone increases growth rate, appetite and dominance in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Animal Behaviour* 48(1): 177-186. doi https://doi.org/10.1006/anbe.1994.1224
- Jones DP and Sies H (2015) The Redox Code. *Antioxidants & redox signaling* 23(9): 734-746. doi 10.1089/ars.2015.6247
- Jonsson E and Björnsson T (2002) Physiological functions of growth hormone in fish with special reference to its influence on behaviour. *Fisheries science* 68(sup1): 742-748. doi 10.2331/fishsci.68.sup1\_742
- Josep AM, Cortés R, Fernández-Durán B, et al. (2013) Melanocortin 4 Receptor Becomes an ACTH Receptor by Coexpression of Melanocortin Receptor Accessory Protein 2. *Mol Endo*. 27(11):1934-1945. doi:10.1210/me.2013-1099
- Jou MJ, Peng TI, Hsu LF, Jou SB, Reiter RJ, Yang CM, Chiao CC, Lin YF, Chen CC (2010) Visualization of melatonin's multiple mitochondrial levels of protection against mitochondrial Ca(2+)-mediated permeability transition and beyond in rat brain astrocytes. *J Pineal Res*. 48(1):20-38. doi: 10.1111/j.1600-079X.2009.00721.x
- Kalamarz H, Nietrzeba M, Fuentes J, Martínez-Rodríguez G, Mancera JM, Kulczykowska E (2009) Melatonin concentrations during larval and post-larval development of gilthead sea bream *Sparus auratus* L.: more than a time-keeping molecule?. *J Fish Biol*. 75, 142-155. doi:10.1111/j.1095-8649.2009.02272.x
- Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Furumichi M, Tanabe M (2012) KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucl Acid Res*. 40(Database issue):D109-D114. doi:10.1093/nar/gkr988
- Karlsen Ø, Norberg B, Kjesbu OS, Taranger GL (2006) Effects of photoperiod and exercise on growth, liver size, and age at puberty in farmed Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *ICES J Mar Sci*. 63,2:355-364, doi:10.1016/j.icesjms.2005.10.013
- Kasperkiewicz P, Poreba M, Snipas SJ, et al. (2015) Design of a Selective Substrate and Activity Based Probe for Human Neutrophil Serine Protease 4. Permyakov EA, ed. *PLoS ONE*. 10(7):e0132818. doi:10.1371/journal.pone.0132818
- Khan NA, Govindaraj P, Meena AK, Thangaraj K (2015) Mitochondrial disorders: Challenges in diagnosis & treatment. *Indi J Med Res*. 141(1):13-26. PMID: PMC4405934
- Khan ZA, Yumnamcha T, Rajiv C, Devi HS, Mondal G, Devi ShD, Bharali R, Chatteraj A (2016) Melatonin biosynthesizing enzyme genes and clock genes in ovary and whole brain of zebrafish (*Danio rerio*): Differential expression and a possible interplay. *Gen Comp Endocrinol*. 233:16-31. doi: 10.1016/j.ygcen.2016.05.014
- Kim KS, Choi HW, Yoon HE, Kim IY. (2010) Reactive Oxygen Species Generated by NADPH Oxidase 2 and 4 Are Required for Chondrogenic Differentiation. *J of Biol Chem*. 285(51):40294-40302. doi:10.1074/jbc.M110.126821



- Kim NN, Choi YJ, et al. (2014) The effect of LED light spectra on antioxidant system by thermal stress in goldfish, *Carassius auratus*. *Molecular & Cellular Toxicology* 10(1): 47-58. doi 10.1007/s13273-014-0006-y
- Kiessling S, Sollars PJ, Pickard GE (2014) Light Stimulates the Mouse Adrenal through a Retinohypothalamic Pathway Independent of an Effect on the Clock in the Suprachiasmatic Nucleus. Gamble KL, ed. *PLoS ONE*. 9(3):e92959. doi:10.1371/journal.pone.0092959
- Knoefler D, Thamsen M, et al. (2012) Quantitative In Vivo Redox Sensors Uncover Oxidative Stress as an Early Event in Life. *Mol cell*. 47(5): 767-776. doi 10.1016/j.molcel.2012.06.016
- Kobayashi H, Oikawa S, Umemura S, Hirosawa I, Kawanishi S (2008) Mechanism of metal-mediated DNA damage and apoptosis induced by 6-hydroxydopamine in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Free Radic Res*. 42(7):651-60. doi: 10.1080/10715760802270334
- Kofuji P, Mure LS, Massman LJ, Purrier N, Panda S, Engeland WC (2016) Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells (ipRGCs) Are Necessary for Light Entrainment of Peripheral Clocks. Tosini G, ed. *PLoS ONE*. 11(12):e0168651. doi:10.1371/journal.pone.0168651
- Komegae EN, Ramos AD, Oliveira AK, Serrano SM, Lopes-Ferreira M, Lima C (2011) Insights into the local pathogenesis induced by fish toxins: role of natterins and natterctin in the disruption of cell-cell and cell-extracellular matrix interactions and modulation of cell migration. *Toxicol*. 58(6-7):509-17. doi: 10.1016/j.toxicol.2011.08.012
- Kopp, N Billecke, J Legradi, M den Broeder, S H Parekh, J Legler (2015) Bringing obesity to light: Rev-erba, a central player in light induced adipogenesis in the zebrafish?. *Int J Obesity*. 40(5):824-32. doi: 10.1038/ijo.2015.240
- Kramer A, Yang FC, Snodgrass P, Li X, Scammell TE, et al. (2001) Regulation of daily locomotor activity and sleep by hypothalamic EGF receptor signaling. *Science* 294:2511-15
- Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol*. 305(3):567-80. doi: 10.1006/jmbi.2000.4315
- Kuang X, Liu C, Fang J, Ma W, Zhang J, Cui S (2016) The tumor suppressor gene *lkb1* is essential for glucose homeostasis during zebrafish early development. *FEBS Lett*, 590: 2076-2085. doi:10.1002/1873-3468.12237
- Kular L, Pakradouni J, Kitabgi P, Laurent M, Martinerie C (2011) The CCN family: a new class of inflammation modulators?. *Biochimie*. 93(3):377-88. doi: 10.1016/j.biochi.2010.11.010
- Kulczykowska E, Kleszczyńska A, Gozdowska M, Sokółowska E (2017) The time enzyme in melatonin biosynthesis in fish: Day/night expressions of three aralkylamine N-acetyltransferase genes in three-spined stickleback. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 208:46-53. doi: 10.1016/j.cbpa.2017.03.005
- Kuse Y, Ogawa K, Tsuruma K, Shimazawa M, Hara H (2014) Damage of photoreceptor-derived cells in culture induced by light emitting diode-derived blue light. *Sci Rep*. 4:5223. doi:10.1038/srep05223
- Lang T, Klasson S, Larsson E, Johansson MEV, Hansson GC, Samuelsson T (2016) Searching the Evolutionary Origin of Epithelial Mucus Protein Components—Mucins and FCGBP. *Mol Biol Evol*. 33(8):1921-1936. doi:10.1093/molbev/msw066
- Lazado CC, Lund I, Pedersen PB, Nguyen HQ (2015). Humoral and mucosal defense molecules rhythmically oscillate during a light-dark cycle in permit, *Trachinotus falcatus*. *Fish Shellfish Immunol*. 47(2):902-12. doi: 10.1016/j.fsi.2015.10.037
- Lazado CC, Skov PV, Pedersen PB (2016) Innate immune defenses exhibit circadian rhythmicity and differential temporal sensitivity to a bacterial endotoxin in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Shellfish Immunol*. 55:613-22. doi: 10.1016/j.fsi.2016.06.040
- Le Roith D, Scavo L, et al. (2001) What is the role of circulating IGF-I? *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 12(2): 48-52
- Lee HR, Kim TD, Kim HJ, Jung Y, Lee D, Lee KH, Kim DY, Woo KC, Kim KT (2015) Heterogeneous ribonucleoprotein R regulates aralkylamine N-acetyltransferase synthesis via internal ribosomal entry site-mediated translation in a circadian manner. *J Pineal Res*. 59(4):518-29. doi: 10.1111/jpi.12284
- Leone A, Roca MS, Ciardiello C, Costantini S, Budillon A (2017) Oxidative Stress Gene Expression Profile Correlates with Cancer Patient Poor Prognosis: Identification of Crucial Pathways Might Select Novel Therapeutic Approaches. *Ox Med Cell Long*. ID 2597581, 18. doi:10.1155/2017/2597581
- Levy S, Allerston CK, Liveanu V, Habib MR, Gileadi O, Schuster G (2016) Identification of LACTB2, a metallo- $\beta$ -lactamase protein, as a human mitochondrial endoribonuclease. *Nucleic Acids Res*. 44(4):1813-1832. doi:10.1093/nar/gkw050



- Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 25(16):2078-2079. doi:10.1093/bioinformatics/btp352
- Li B and Dewey CN (2011) RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*. 12:323. doi:10.1186/1471-2105-12-323
- Li J-Y, Patterson M, Mikkola HKA, Lowry WE, Kurdistani SK (2012) Dynamic Distribution of Linker Histone H1.5 in Cellular Differentiation. *PLoS Genet* 8(8): e1002879. doi:10.1371/journal.pgen.1002879
- Li Y, Li G, Wang H, Du J, Yan J (2013) Analysis of a Gene Regulatory Cascade Mediating Circadian Rhythm in Zebrafish. *PLoS Comput Biol*9(2): e1002940. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002940>
- Li C, Beck BH, Fuller SA, Peatman E (2014) Transcriptome annotation and marker discovery in white bass (*Morone chrysops*) and striped bass (*Morone saxatilis*). *Anim Genet*. 45(6):885-7. doi: 10.1111/age.12211
- Li Y, Li G, Görling B, Luy B, Du J, Yan J. (2015a) Integrative Analysis of Circadian Transcriptome and Metabolic Network Reveals the Role of De Novo Purine Synthesis in Circadian Control of Cell Cycle. Hogenesch JB, ed. *PLoS Computational Biology*. 2015;11(2):e1004086. doi:10.1371/journal.pcbi.1004086
- Li M, Gu Y, Ma Y-C, et al (2015b) Krüppel-Like Factor 5 Promotes Epithelial Proliferation and DNA Damage Repair in the Intestine of Irradiated Mice. *Int J Biol Sci*.11(12):1458-1468. doi:10.7150/ijbs.13444
- Li Y-H, Wang H-P, Yao H, et al. (2017) De novo transcriptome sequencing and analysis of male, pseudo-male and female yellow perch, *Perca flavescens*. *Englert C, ed. PLoS ONE*.12(2):e0171187. doi:10.1371/journal.pone.0171187
- Lima-Cabello E, Díaz-Casado ME, Guerrero JA, Ojalora BB, Escames G, López LC, Reiter RJ and Acuña-Castroviejo D (2014) A review of the melatonin functions in zebrafish physiology. *J. Pineal Res*. 57: 1–9. doi:10.1111/jpi.12149
- Liu J, Litt L, et al. (2011) Metabolomics of Oxidative Stress in Recent Studies of Endogenous and Exogenously Administered Intermediate Metabolites. *International journal of molecular sciences* 12(10): 6469-6501. doi 10.3390/ijms12106469
- Liu L, Li Y, Li S, et al. (2012) Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012;2012:251364. doi:10.1155/2012/251364
- Liu LW, Sui YZ, Zhu WB, Guo A, Xu KD, Zhou YD (2017) In-depth transcriptome analysis of *Larimichthys polyactis*, de novo assembly, functional annotation. *Mar Genomics*. 33:27-29. doi: 10.1016/j.margen.2017.02.002
- Liu Y, Li X, Xu GF, Bai SY, Zhang YQ, Gu W, Mou ZB (2015) Effect of photoperiod manipulation on the growth performance of juvenile lenok, *Brachymystax lenok* (Pallas, 1773). *J Appl Ichthyol*. 31: 120–124. doi: 10.1111/jai.12632
- Lopes-Ferreira M, Grund LZ, Lima C (2014) Thalassophryne nattereri fish venom: from the envenoming to the understanding of the immune system. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 20:35. doi:10.1186/1678-9199-20-35
- López-Olmeda JF, Montoya A, et al. (2009) Synchronization to light and restricted-feeding schedules of behavioral and humoral daily rhythms in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Chronobiol int*. 26(7): 1389-1408. doi 10.3109/07420520903421922
- López-Olmeda B, Blanco-Vives I, Pujante M, Wunderink YS, Mancera JM & Sánchez-Vázquez FJ (2013) Daily rhythms in the hypothalamus-pituitary-interrenal axis and acute stress responses in a teleost flatfish, *Solea senegalensis*. *Chronobiol Int* 30 530–539. doi:10.3109/07420528.2012.754448
- López-Patiño MA, Gesto M, Conde-Sieira M, Soengas JL, Míguez JM (2014) Stress inhibition of melatonin synthesis in the pineal organ of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is mediated by cortisol. *J Exp Biol*. 217: 1407-1416. doi: 10.1242/jeb.087916
- Lu KL, Ji ZL, Rahimnejad S, Zhang CX, Wang L, Song K (2017) De novo assembly and characterization of seabass *Lateolabrax japonicus* transcriptome and expression of hepatic genes following different dietary phosphorus/calcium levels. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*. 24:51-59. doi: 10.1016/j.cbd.2017.08.001
- Luft, FC (2008) CCN2, the connective tissue growth factor. *J Mol Med*. 86: 1. doi.10.1007/s00109-007-0287-x
- Luo Z, Ge M, Chen J, et al. (2017) HRS plays an important role for TLR7 signaling to orchestrate inflammation and innate immunity upon EV71 infection. *Evans DT, ed. PLoS Pathogens*. 13(8):e1006585. doi:10.1371/journal.ppat.1006585
- Magalhães GS1, Lopes-Ferreira M, Junqueira-de-Azevedo IL, Spencer PJ, Araújo MS, Portaro FC, Ma L, Valente RH, Juliano L, Fox JW, Ho PL, Moura-da-Silva AM (2005) Natterins, a new class of proteins with kininogenase activity characterized from *Thalassophryne nattereri* fish venom. *Biochimie*. 87(8):687-99. doi: 10.1016/j.biochi.2005.03.016



- Maitra SK and Hasan KN. The Role of Melatonin as a Hormone and an Antioxidant in the Control of Fish Reproduction. *Front Endo.* 2016;7:38. doi:10.3389/fendo.2016.00038
- Majed SA, Wells RMG, Mcardle BH (2002) Seasonal effect on lactate dehydrogenase and citrate synthase in snapper (*Pagrus auratus*) *New Zeal J Mar Fresh Res.* 36:1, 233-239, doi: 10.1080/00288330.2002.9517082
- Malachowicz M, Wenne R, Burzynski A (2017) De novo assembly of the sea trout (*Salmo trutta m. trutta*) skin transcriptome to identify putative genes involved in the immune response and epidermal mucus secretion. *Prunet P*, ed. *PLoS ONE.* 12(2):e0172282. doi:10.1371/journal.pone.0172282
- Mano-Otagiri A, Nemoto T, Sekino A, et al. (2006) Growth Hormone-Releasing Hormone (GHRH) Neurons in the Arcuate Nucleus (Arc) of the Hypothalamus Are Decreased in Transgenic Rats Whose Expression of Ghrelin Receptor Is Attenuated: Evidence that Ghrelin Receptor Is Involved in the Up-Regulation of GHRH Expression in the Arc, *Endo.* 147;9,1,4093–4103. doi:10.1210/en.2005-1619
- Marinho HS, Real C, et al. (2014) Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox biology* 2: 535-562. doi 10.1016/j.redox.2014.02.006
- Markus RP, Cecon E, Pires-Lapa MA (2013) Immune-Pineal Axis: Nuclear Factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) Mediates the Shift in the Melatonin Source from Pinealocytes to Immune Competent Cells. *Int J Mol Sci.* 14(6):10979-10997. doi:10.3390/ijms140610979.
- Marques IJ, Leito JT, Spaink HP, Testerink J, Jaspers RT, Witte F, van den Berg S, Bagowski CP. (2008) Transcriptome analysis of the response to chronic constant hypoxia in zebrafish hearts. *J. Comp. Physiol. B* 178, 77–92. doi:10.1007/s00360-007-0201-4
- Martinez-Chavez CC, Al-Khamees S, Campos-Mendoza A, Penman DJ, Migaud H (2008) Clock-controlled endogenous melatonin rhythms in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus niloticus*) and African catfish (*Clarias gariepinus*). *Chronobiol Int.* 31-49. doi: 10.1080/07420520801917547
- Martínez-Chávez CC, Tello-Ballinas A, Fonseca-Madrigal J, Ross LG and Martínez-Palacios CA (2014) Photoperiodic growth enhancement in a tropical batch spawning atherinopsid, pike silverside *Chirostoma estor*. *J Fish Biol.* 85: 546–553. doi: 10.1111/jfb.12442
- Martínez-Palacios CA, Comas-Morte J, Tello-Ballinas JA, Toledo-Cuevas M, Ross LG (2004) The effects of saline environments on survival and growth of eggs and larvae of *Chirostoma estor estor* Jordan 1880 (Pisces: Atherinidae). *Aqua.* 238:509-522. doi:10.1016/j.aquaculture.2003.10.032
- Martínez-Palacios CA, Racotta IS, Ríos-Duran MG, Palacios E, Toledo-Cuevas M, Ross LG (2006) Advances in applied research for the culture of Mexican silversides (*Chirostoma*, Atherinopsidae). *Biocell.* 30:137-148
- Martins RST, Gomez A, Zanuy S, Carrillo M, Canário AVM (2015) Photoperiodic Modulation of Circadian Clock and Reproductive Axis Gene Expression in the Pre-Pubertal European Sea Bass Brain. *Cermakian N*, ed. *PLoS ONE.* 10(12):e0144158. doi:10.1371/journal.pone.0144158
- Mata-Sotres JA, Martínez-Rodríguez G, Pérez-Sánchez J, Sánchez-Vázquez FJ, Yúfera M (2015) Daily rhythms of clock gene expression and feeding behavior during the larval development in gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Chronobiol Int.* 32(8):1061-74 doi: 10.3109/07420528.2015.1058271
- Menzies RI, Zhao X, Mullins LJ, et al (2017) Transcription controls growth, cell kinetics and cholesterol supply to sustain ACTH responses. *Endo Connect.* 6(7):446-457. doi:10.1530/EC-17-0092
- Migaud H, Cowan M, et al. (2007) The effect of spectral composition and light intensity on melatonin, stress and retinal damage in post-smolt Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture* 270(1): 390-404. doi http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.064
- Migaud H and Davie A, et al. (2007) Evidence for differential photic regulation of pineal melatonin synthesis in teleosts. *Journal of pineal research* 43(4): 327-335. doi 10.1111/j.1600-079X.2007.00480.x
- Mitchell HA and Weinschenker D (2010) Good Night and Good Luck: Norepinephrine in Sleep Pharmacology. *Biochem pharmacol.* 79(6):801-809. doi:10.1016/j.bcp.2009.10.004
- Moghadam HK, Johnsen H, Robinson N, et al. (2017) Impacts of Early Life Stress on the Methyloome and Transcriptome of Atlantic Salmon. *Sci Rep.* 7:5023. doi:10.1038/s41598-017-05222-2.
- Mokalled MH, Patra C, Dickson AL, Endo T, Stainier DY, Poss KD (2016) Injury-induced *ctgfa* directs glial bridging and spinal cord regeneration in zebrafish. *Science.* 354(6312):630-634. doi: 10.1126/science.aaf2679
- Montoya A, López-Olmeda JF, et al. (2010) Synchronization of daily rhythms of locomotor activity and plasma glucose, cortisol and thyroid hormones to feeding in Gilthead seabream (*Sparus aurata*) under a light-dark cycle. *Physiology &*



behavior 101(1): 101-107. doi 10.1016/j.physbeh.2010.04.019

- Muñoz-Pérez JL, López-Patiño MA, Álvarez-Otero R. et al. (2016) Characterization of melatonin synthesis in the gastrointestinal tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): distribution, relation with serotonin, daily rhythms and photoperiod regulation. *J Comp Physiol B*. 186: 471. doi:10.1007/s00360-016-0966-4
- Nagasawa K, Giannetto A, Fernandes JMO (2012) Photoperiod Influences Growth and mll (Mixed-Lineage Leukaemia) Expression in Atlantic Cod. *PLoS ONE* 7(5): e36908. doi:10.1371/journal.pone.0036908
- Nakanishi-Ueda T, Majima HJ, Watanabe K, Ueda T, Indo HP, Suenaga S et al (2013) Blue LED light exposure develops intracellular reactive oxygen species, lipid peroxidation, and subsequent cellular injuries in cultured bovine retinal pigment epithelial cells. *Free Radic Res* 2013; 47: 774–780. doi. 10.3109/10715762.2013.829570
- Nakashima Y, Ohta S, Wolf AM (2017) Blue light-induced oxidative stress in live skin, *Free Rad Biol Med*, ISSN 0891-5849. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.03.010
- Nandan MO, Ghaleb AM, Bialkowska AB, Yang VW (2015) Krüppel-like factor 5 is essential for proliferation and survival of mouse intestinal epithelial stem cells. *Stem Cell Res*.14(1):10-19. doi:10.1016/j.scr.2014.10.008
- Nasrallah CN and Horvath TL (2014) Mitochondrial dynamics in the central regulation of metabolism. *Nat Rev Endo*. 10, 650–658. doi:10.1038/nrendo.2014.160
- Nelson LE and Sheridan MA (2005) Regulation of somatostatins and their receptors in fish. *General and comparative endocrinology* 142(1-2): 117-133. doi 10.1016/j.ygcen.2004.12.002
- Nikaido Y, Aluru N, McGuire A, Park YJ, Vijayan MM, Takemura A (2010) Effect of cortisol on melatonin production by the pineal organ of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 155(1):84-90. doi: 10.1016/j.cbpa.2009.10.006
- Niki E (2016) Oxidative stress and antioxidants: Distress or eustress? *Arch Biochem Biophys*. 2016 Apr 1;595:19-24. doi: 10.1016/j.abb.2015.11.017
- Nordgarden U, Oppedal F, Taranger GL, Hemre G-I, Hansen T (2003) Seasonally changing metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) Growth and feed conversion ratio. *Aqua Nut*, 9: 287–293. doi:10.1046/j.1365-2095.2003.00256.x
- Ogórek M1, Gąsior Ł1, Pierzchała O1, Daszkiewicz R1, Lenartowicz M (2017) Role of copper in the process of spermatogenesis. *Postepy Hig Med Dosw*.71(0):663-683. doi: 10.5604/01.3001.0010.3846
- Oh IS, Shimizu H, et al. (2006) Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature* 443(7112): 709-712. doi 10.1038/nature05162
- Oliveira CCV, Aparício R, et al. (2013) Endocrine (plasma cortisol and glucose) and behavioral (locomotor and self-feeding activity) circadian rhythms in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858) exposed to light/dark cycles or constant light. *Fish physiology and biochemistry* 39(3): 479-487. doi 10.1007/s10695-012-9713-2
- Oyinloye BE, Adenowo AF, Kappo AP (2015) Reactive Oxygen Species, Apoptosis, Antimicrobial Peptides and Human Inflammatory Diseases. *Vanden Eynde JJ, ed. Pharmaceuticals*. 8(2):151-175. doi:10.3390/ph8020151
- Pálfy M, Reményi A, Korcsmáros T (2012) Endosomal crosstalk: meeting points for signaling pathways. *Trends Cell Biol*. 22(9):447-456. doi:10.1016/j.tcb.2012.06.004
- Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Spence DW, Cardinali DP (2007) Role of the melatonin system in the control of sleep: therapeutic implications. *CNS drugs*. 21:995–1018. PMID: 18020480
- Patel DM, Brinchmann MF (2017) Skin mucus proteins of lumpsucker (*Cyclopterus lumpus*). *Biochem Biophys Rep*. 9:217-225. doi:10.1016/j.bbrep.2016.12.016
- Peatman E, Lange M, Zhao H, Beck BH (2015) Physiology and immunology of mucosal barriers in catfish (*Ictalurus spp.*). *Tissue Barriers*. 3(4):e1068907. doi:10.1080/21688370.2015.1068907
- Perera NC, Schilling O, Kittel H, Back W, Kremmer E, Jenne DE (2012) NSP4, an elastase-related protease in human neutrophils with arginine specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109(16):6229–34. doi: 10.1073/pnas.1200470109
- Perera N. C., Wiesmüller K.-H., Larsen M. T., et al. (2013) NSP4 is stored in azurophil granules and released by activated neutrophils as active endoprotease with restricted specificity. *J Immunol*. 191(5):2700–2707. doi: 10.4049/jimmunol.1301293
- Peter RE and Chang JP (1999) Brain Regulation of Growth Hormone Secretion and Food Intake in Fish. In: Prasad Rao PD and Peter RE (eds) *Neural Regulation in the Vertebrate Endocrine System: Neuroendocrine Regulation*. Springer US, Boston, MA, pp. 55-67.



- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods*. 8(10):785-6. doi: 10.1038/nmeth.1701. doi: 10.1038/nmeth.1701
- Pevet P and Challet E (2011) Melatonin: both master clock output and internal time-giver in the circadian clocks network. *Journal of physiology, Paris* 105(4-6): 170-182. doi 10.1016/j.jphysparis.2011.07.001
- Picha ME, Strom CN, et al. (2009) Plasma ghrelin and growth hormone regulation in response to metabolic state in hybrid striped bass: effects of feeding, ghrelin and insulin-like growth factor-I on in vivo and in vitro GH secretion. *General and comparative endocrinology* 161(3): 365-372. doi 10.1016/j.ygcen.2009.01.026
- Pickering AD and Pottinger TG (1983) Seasonal and diel changes in plasma cortisol levels of the brown trout, *Salmo trutta* L. *Gen Comp Endo*. 49 232–239. doi:10.1016/0016-6480(83)90139-9
- Pittman K, Yúfera M, Pavlidis M, Geffen AJ, Koven W, Ribeiro L, Zambonino-Infante JL, Tandler A (2013) Fantastically plastic: fish larvae equipped for a new world. *Rev Aqua*. 5: S224–S267. doi: 10.1111/raq.12034
- Planas J, Gutiérrez J, Fernández J, Carrillo M, Canals P (1990) Annual and daily variations of plasma cortisol in sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Aqua*. 91 171–178. doi:10.1016/0044-8486(90)90186-Q
- Powell S, Szklarczyk D, Trachana K, et al. (2012) eggNOG v3.0: orthologous groups covering 1133 organisms at 41 different taxonomic ranges. *Nucl Acid Res*. 40(Database issue):D284-D289. doi:10.1093/nar/gkr1060
- Punta M, Coggill PC, Eberhardt RY, et al. (2012) The Pfam protein families database. *Nucl Acid Res*.40(Database issue):D290-D301. doi:10.1093/nar/gkr1065
- Purushothaman S, Saxena S, Meghah V, Meena Lakshmi MG, Singh SK, Brahmendra Swamy CV, Idris MM (2015) Proteomic and gene expression analysis of zebrafish brain undergoing continuous light/dark stress. *J Sleep Res*. 24(4):458-65. doi: 10.1111/jsr.12287
- Rajiv C, Sanjita Devi H, Mondal G, Devi SD, Khan ZA, Yumnamcha T, Bharali R, Chatteraj A (2017) Daily and seasonal expression profile of serum melatonin and its biosynthesizing enzyme genes (*tph1*, *aanat1*, *aanat2*, and *hiomt*) in pineal organ and retina: a study under natural environmental conditions in a tropical carp, *catla catla*. *J Exp Zool* 325A:688–700. doi: 10.1002/jez.2061
- Redlin U (2001) Neural basis and biological function of masking by light in mammals: suppression of melatonin and locomotor activity. *Chronobiology international* 18(5): 737-758
- Richter C, Woods IG, Schier AF (2014) Neuropeptidergic control of sleep and wakefulness. *Annu Rev Neurosci*. 37:503-31. doi: 10.1146/annurev-neuro-062111-150447
- Rivera-Durán NK (2016) Expresión génica de las principales enzimas digestivas del pez blanco de Pátzcuaro (*Chirostoma estor*), durante su desarrollo larvario y juveniles. Director: Dra. Toledo-Cuevas EM, Codirector: Dr. Daniel Tovar Ramírez. Tesis de Maestría Institucional en Ciencias Biológicas. UMSNH.
- Roberts A and Pachter L. (2013) Streaming fragment assignment for real-time analysis of sequencing experiments. *Nat meth*. 10(1):71-73. doi:10.1038/nmeth.2251
- Robinson MD, Oshlack A (2010) A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Gen Biol*.11(3):R25. doi:10.1186/gb-2010-11-3-r25
- Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, et al. (2011) Integrative Genomics Viewer. *Nat biotech*. 29;(1):24-26. doi:10.1038/nbt.1754
- Rønnestad I, Gomes AS, Murashita K, Angotzi R, Jönsson E, Volkoff H (2017) Appetite-Controlling Endocrine Systems in Teleosts. *Front Endo*. 8:73. doi:10.3389/fendo.2017.00073
- Rosengren M, Thörnqvist PO, Winberg S, Sundell K (2017) The brain-gut axis of fish: Rainbow trout with low and high cortisol response show innate differences in intestinal integrity and brain gene expression. *Gen Comp Endocrinol*. pii: S0016-6480(17)30658-5. doi: 10.1016/j.ygcen.2017.09.020
- Rotllant J, Liu D, Yan Y-L, Postlethwait JH, Westerfield M, Du S-J (2008) Sparc (Osteonectin) functions in morphogenesis of the pharyngeal skeleton and inner ear. *Matrix Biol: J Int Soc Matrix Biol*. 27(6):561-572. doi:10.1016/j.matbio.2008.03.001
- Rutkowski DT and Hegde RS (2010) Regulation of basal cellular physiology by the homeostatic unfolded protein response. *J Cell Biol* 189: 783–794. doi: 10.1083/jcb.201003138
- Ryll B, Sanchez S, Haitina T, Tafforeau P, Ahlberg PE (2014) The genome of *Callorhinchus* and the fossil record: a new perspective on SCPP gene evolution in gnathostomes. *Evol & Develop*. 16(3):123-124. doi:10.1111/ede.12071



- Saad M, Cavanaugh K, Verbueken E, Pype C, Casteleyn C, Van Ginneken C, Van Cruchten S (2016) Xenobiotic metabolism in the zebrafish: a review of the spatiotemporal distribution, modulation and activity of Cytochrome P450 families 1 to 3. *J Toxicol Sci.* 41(1):1-11. doi: 10.2131/jts.41.1
- Sakamoto T and McCormick SD (2006) Prolactin and growth hormone in fish osmoregulation. *General and comparative endocrinology* 147(1): 24-30. doi 10.1016/j.ygcen.2005.10.008
- Sallin P and Jaźwińska A (2016) Acute stress is detrimental to heart regeneration in zebrafish. *Open Biol.* 6(3):160012. doi:10.1098/rsob.160012
- Sanchez JA, López-Olmeda JF, et al. (2009) Effects of feeding schedule on locomotor activity rhythms and stress response in sea bream. *Physiology & behavior* 98(1-2): 125-129. doi 10.1016/j.physbeh.2009.04.020
- Sánchez-Bretaña A, Gueguen MM, Cano-Nicolau J, Kah O, Alonso-Gómez ÁL, Delgado MJ & Isorna E (2015) Anatomical distribution and daily profile of *gper1b* gene expression in brain and peripheral structures of goldfish (*Carassius auratus*). *Chronobiol Int.* 32 889–902. doi:10.3109/07420528.2015.1049615
- Sapru HN (2013) Role of the hypothalamic arcuate nucleus in cardiovascular regulation. *Auto neuro.*175(0):38-50. doi:10.1016/j.autneu.2012.10.016
- Sato T, Nakamura Y, et al. (2012) Structure, regulation and function of ghrelin. *Journal of biochemistry* 151(2): 119-128. doi 10.1093/jb/mvr134
- Schibler U, Gotic I, Saini C, Gos P, Curie T, Emmenegger Y, Sinturel F, et al. (2015) Clock-talk: interactions between central and peripheral circadian oscillators in mammals. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 80 223–232. doi:10.1101/sqb.2015.80.027490
- Schomerus C and Korf H-W (2005) Mechanisms Regulating Melatonin Synthesis in the Mammalian Pineal Organ. *Ann N Y Acad Sci.* 1057: 372–383. doi:10.1196/annals.1356.028
- Shaughnessy DT, McAllister K, Worth L, et al. (2014) Mitochondria, Energetics, Epigenetics, and Cellular Responses to Stress. *Env Health Pers.* 122(12):1271-1278. doi:10.1289/ehp.1408418
- Sheridan MA and Hagemeister AL (2010) Somatostatin and somatostatin receptors in fish growth. *General and comparative endocrinology* 167(3): 360-365. doi 10.1016/j.ygcen.2009.09.002
- Shin HS, Lee J, et al. (2011) Effects of LED light spectra on oxidative stress and the protective role of melatonin in relation to the daily rhythm of the yellowtail clownfish, *Amphiprion clarkii*. *Comparative biochemistry and physiology Part A, Molecular & integrative physiology* 160(2): 221-228. doi 10.1016/j.cbpa.2011.06.002
- Shin HS, Kim NN, et al. (2014) Retinal light input regulates clock genes and immune function in yellowtail clownfish (*Amphiprion clarkii*). *Biological Rhythm Research* 45(4): 541-556. doi 10.1080/09291016.2013.870757
- Siegenthaler PF, Zhao Y, Zhang K, Fent K (2017) Reproductive and transcriptional effects of the antiandrogenic progestin chlormadinone acetate in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Pollut.* 223:346-356. doi: 10.1016/j.envpol.2017.01.031
- Sies H (2014) Role of Metabolic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Generation: Redox signaling and oxidative stress. *The Journal of biological chemistry* 289(13): 8735-8741. doi 10.1074/jbc.R113.544635
- Sies H, Berndt C, et al. (2017) Oxidative Stress. *Annual review of biochemistry* 86(1): 715-748. doi 10.1146/annurev-biochem-061516-045037
- Sies H (2017) Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol.* 11:613-619. doi:10.1016/j.redox.2016.12.035
- Singh PP, Arora J, Isambert H (2015) Identification of Ohnolog Genes Originating from Whole Genome Duplication in Early Vertebrates, Based on Synteny Comparison across Multiple Genomes. *Christos A, ed. PLoS Comp Biol.* 11(7):e1004394. doi:10.1371/journal.pcbi.1004394
- Solomon SG and Okomoda VT (2012) Effect of photoperiod on some biological parameters of *Clarias gariepinus* juvenile. *J. Stress Phy & Biochem.* 8:4. 47-54. [jspb.ru/issues/2012/N4/JSPB\\_2012\\_4\\_47-54.pdf](http://jspb.ru/issues/2012/N4/JSPB_2012_4_47-54.pdf)
- Sousa JC, Magalhães-Marques KK, da Silveira Cruz-Machado S, Moraes MN, Castrucci AM de L (2017) Dexamethasone Modulates Nonvisual Opsins, Glucocorticoid Receptor, and Clock Genes in *Danio rerio* ZEM-2S Cells. *BioMed Res Int.* 2017:8459385. doi:10.1155/2017/8459385
- Spieler RE and Noeske TA (1981) Timing of a single daily meal and diel variations of serum thyroxine, triiodothyronine and cortisol in goldfish *Carassius auratus*. *Life sciences* 28(26): 2939-2944
- Spieler RE and Noeske TA (1984) Effects of Photoperiod and Feeding Schedule on Diel Variations of Locomotor



- Activity, Cortisol, and Thyroxine in Goldfish. *Transactions of the American Fisheries Society* 113(4): 528-539. doi 10.1577/1548-8659(1984)113<528:EOPAFS>2.0.CO;2
- Spiga F, Walker JJ, Terry JR, Lightman SL (2014) HPA axis-rhythms. *Compr Physiol.* 4 1273–1298. doi:10.1002/cphy.c140003
- Stefano AV, Vissio PG, et al. (1999) Colocalization of GnRH binding sites with gonadotropin-, somatotropin-, somatolactin-, and prolactin-expressing pituitary cells of the pejerrey, *Odontesthes bonariensis*, in vitro. *General and comparative endocrinology* 116(1): 133-139. doi 10.1006/gcen.1999.7354
- Stengel A, Goebel M, et al. (2010) Ghrelin, des-acyl ghrelin and nesfatin-1 in gastric X/A-like cells: role as regulators of food intake and body weight. *Peptides* 31(2): 357-369. doi 10.1016/j.peptides.2009.11.019
- Stengel A and Tache Y (2012) Gastric peptides and their regulation of hunger and satiety. *Current gastroenterology reports* 14(6): 480-488. doi 10.1007/s11894-012-0291-3
- Stern BR1, Solioz M, Krewski D, Aggett P, Aw TC, Baker S, Crump K, Dourson M, Haber L, Hertzberg R, Keen C, Meek B, Rudenko L, Schoeny R, Slob W, Starr T (2007) Copper and human health: biochemistry, genetics, and strategies for modeling dose-response relationships. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.*10(3):157-222. doi: 10.1080/10937400600755911
- Strozyk E and Kulms D (2013) The Role of AKT/mTOR Pathway in Stress Response to UV-Irradiation: Implication in Skin Carcinogenesis by Regulation of Apoptosis, Autophagy and Senescence. *Int J Mol Sci.* 14(8):15260-15285. doi:10.3390/ijms140815260
- Sun S, Ge X, Zhu J, Zhang W, Xuan F (2016a) De novo assembly of the blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) gill transcriptome to identify ammonia exposure associated microRNAs and their targets. *Res Immun.* 6:21-27. doi:10.1016/j.rnim.2016.03.001
- Sun Y, Huang Y, Li X, et al. (2016b) Fish-T1K (Transcriptomes of 1,000 Fishes) Project: large-scale transcriptome data for fish evolution studies *GigaScience.*5:18. doi:10.1186/s13742-016-0124-7
- Sun P, Bao P, Tang B. (2017) Transcriptome analysis and discovery of genes involved in immune pathways in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) under high stocking density stress. *Fish Shellfish Immunol.* 68:332-340. doi: 10.1016/j.fsi.2017.07.013
- Tadic V, Prell T, Lautenschlaeger J, Grosskreutz J (2014) The ER mitochondria calcium cycle and ER stress response as therapeutic targets in amyotrophic lateral sclerosis. *Front. Cell. Neurosci.* doi:10.3389/fncel.2014.00147
- Tahara Y, Aoyama S, et al. (2017) The mammalian circadian clock and its entrainment by stress and exercise. *The Journal of Physiological Sciences* 67(1): 1-10. doi 10.1007/s12576-016-0450-7
- Tait SWG, Ichim G, Green DR (2014) Die another way – non-apoptotic mechanisms of cell death. *J Cell Sci.*127(10):2135-2144. doi:10.1242/jcs.093575
- Takahashi A, Kasagi S, Murakami N, Furufuji S, Kikuchi S, Mizusawa K, Andoh T (2016) Chronic effects of light irradiated from LED on the growth performance and endocrine properties of barfin flounder *Verasper moseri*. *Gen Comp Endo.* 232:101-108. doi:10.1016/j.ygcen.2016.01.008
- Takahashi A, Kasagi S, Murakami N, Furufuji S, Kikuchi S, Mizusawa K, Andoh T (2017) Effects of different green light intensities on the growth performance and endocrine properties of barfin flounder *Verasper moseri*. *Gen Comp Endocrinol.* S0016-6480(17)30265-4. doi: 10.1016/j.ygcen.2017.04.003
- Tatusov RL, Fedorova ND, Jackson JD, et al. (2003) The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinformatics.* 4:41. doi:10.1186/1471-2105-4-41
- The Gene Ontology Consortium (2013) Gene Ontology Annotations and Resources. *Nucl Acid Res.* 41(Database issue):D530-D535. doi:10.1093/nar/gks1050
- The UniProt Consortium (2008) The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucl Acid Res.* 36(Database issue):D190-D195. doi:10.1093/nar/gkm895
- Toda C and Diano S (2014) Mitochondrial UCP2 in the central regulation of metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 28(5):757-64. doi: 10.1016/j.beem.2014.02.006
- Toyama R, Chen X, Jhavar N, et al. (2009) Transcriptome analysis of the zebrafish pineal gland. *Develop dyn.* 238(7):1813-1826. doi:10.1002/dvdy.21988
- Trapnell C, Williams BA, Pertea G, et al. (2010) Transcript assembly and abundance estimation from RNA-Seq reveals thousands of new transcripts and switching among isoforms. *Nat biotech.* 28(5):511-515. doi:10.1038/nbt.1621



- Trejchel, K., Żarski, D., Palińska-Żarska, K. et al (2014) Determination of the optimal feeding rate and light regime conditions in juvenile burbot, *Lota lota* (L.), under intensive aquaculture. *Aquacult Int.* 22: 195. doi:10.1007/s10499-013-9670-5
- Trotter AJ, Battaglione SC, et al. (2003) Effects of photoperiod and light intensity on initial swim bladder inflation, growth and post-inflation viability in cultured striped trumpeter (*Latris lineata*) larvae. *Aquaculture* 224(1): 141-158. doi https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00212-6
- Trudeau VL (1997) Neuroendocrine regulation of gonadotrophin II release and gonadal growth in the goldfish, *Carassius auratus*. *Reviews of reproduction* 2(1): 55-68
- Unniappan S and Peter RE (2005) Structure, distribution and physiological functions of ghrelin in fish. *Comparative biochemistry and physiology Part A, Molecular & integrative physiology* 140(4): 396-408. doi 10.1016/j.cbpa.2005.02.011
- Unniappan S (2010) Ghrelin: an emerging player in the regulation of reproduction in non-mammalian vertebrates. *General and comparative endocrinology* 167(3): 340-343. doi 10.1016/j.ygcen.2009.12.003
- Vannuvel K, Renard P, Raes M, Arnould, T (2013) Functional and morphological impact of ER stress on mitochondria. *J. Cell. Physiol.* 228, 1802–1818. doi: 10.1002/jcp.24360
- Velloso CP (2008) Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-I. *British journal of pharmacology* 154(3): 557-568. doi 10.1038/bjp.2008.153
- Venkatesh S, Lee J, Singh K, Lee I, Suzuki CK (2012) Multitasking in the mitochondrion by the ATP-dependent Lon protease. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 56–66. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.11.003
- Vera LM, De Pedro N, et al. (2007) Feeding entrainment of locomotor activity rhythms, digestive enzymes and neuroendocrine factors in goldfish. *Physiology & behavior* 90(2-3): 518-524. doi 10.1016/j.physbeh.2006.10.017
- Vera LM, Davie A, et al. (2010) Differential light intensity and spectral sensitivities of Atlantic salmon, European sea bass and Atlantic cod pineal glands ex vivo. *General and comparative endocrinology* 165(1): 25-33. doi 10.1016/j.ygcen.2009.05.021
- Vera LM, Montoya A, et al. (2014) Acute stress response in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) is time-of-day dependent: Physiological and oxidative stress indicators. *Chronobiology international* 31(9): 1051-1061. doi 10.3109/07420528.2014.945646
- Veras GC, Murgas LDS, Rosa PV, Zangeronimo MG, Ferreira MSS, Leon JAS (2013) Effect of photoperiod on locomotor activity, growth, feed efficiency and gonadal development of Nile tilapia. *Rev. Bras. Zootec.* 42(12), 844-849. doi.org/10.1590/S1516-35982013001200002
- Veras GC, Brabo MF, Dias JA, Abe HA, Nunes ZMP, Murgas LDS (2016) The effect of photoperiod and feeding frequency on larval of the Amazonian ornamental fish *Pyrrhulina brevis* (Steindachner, 1876). *Aqua Res.* 47: 797–803. doi: 10.1111/are.12538
- Vidotto M, Grapputo A, Boscaro E, et al. (2013) Transcriptome sequencing and de novo annotation of the critically endangered Adriatic sturgeon *BMC Genomics*. 14:407. doi:10.1186/1471-2164-14-407
- Villamizar N, García-Alcazar A, Sánchez-Vázquez FJ (2009) Effect of light spectrum and photoperiod on the growth, development and survival of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aqua* 292 80–86. doi. 10.1016/j.aquaculture.2009.03.045
- Villamizar N, Blanco-Vives B, Migaud H, Davie A, Carboni S, Sanchez-Vazquez FJ (2011) Effects of light during early larval development of some aquacultured teleosts: a review. *Aquaculture* 315, 86–94. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.10.036
- Villamizar N, Vera LM, Foulkes NS, Sánchez-Vázquez FJ (2014) Effect of Lighting Conditions on Zebrafish Growth and Development. *Zebrafish* 11(2):173-181. doi.10.1089/zeb.2013.0926
- Volkoff H, Canosa LF, et al. (2005) Neuropeptides and the control of food intake in fish. *General and comparative endocrinology* 142(1-2): 3-19. doi 10.1016/j.ygcen.2004.11.001
- Volkoff H, Hoskins LJ, Tuziak SM (2010) Influence of intrinsic signals and environmental cues on the endocrine control of feeding in fish: Potential application in aquaculture. *Gen Comp Endo.* 167: 3, 352-359. doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.09.001
- Volkoff H (2016) The Neuroendocrine Regulation of Food Intake in Fish: A Review of Current Knowledge. *Front. Neurosci.* 10:540. doi: 10.3389/fnins.2016.00540
- Vozza A, Parisi G, De Leonardi F, Lasorsa FM, Castegna A, Amorese D, et al. (2014) UCP2 transports C4 metabolites



- out of mitochondria, regulating glucose and glutamine oxidation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111, 960–965. doi: 10.1073/pnas.1317400111
- Vriend J and Reiter RJ (2015) Melatonin feedback on clock genes: a theory involving the proteasome. J. Pineal Res. 58: 1–11. doi:10.1111/jpi.12189
- Wakitani S, Nawata M, Tensho K, Okabe T, Machida H, Ohgushi HJ (2007) Repair of articular cartilage defects in the patello-femoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation: three case reports involving nine defects in five knees. Tissue Eng Regen Med. 2007 Jan-Feb;1(1):74-9. doi: 10.1002/term.8
- Wang X, Newkirk RF, Carre W, Ghose P, Igobudia B, Townsel JG, Cogburn LA (2009) BMB Rep. Regulation of ANKRD9 expression by lipid metabolic perturbations.. 2009 Sep 30;42(9):568-73. PMID: 19788857
- Wang L, Si Y, Dedow LK, Shao Y, Liu P, Brutnell TP (2011) A Low-Cost Library Construction Protocol and Data Analysis Pipeline for Illumina-Based Strand-Specific Multiplex RNA-Seq. PLoS ONE 6(10): e26426. doi:10.1371/journal.pone.0026426
- Wang S, Furmanek T, Kryvi H, et al. (2014) Transcriptome sequencing of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) notochord prior to development of the vertebrae provides clues to regulation of positional fate, chordoblast lineage and mineralisation. BMC Genomics.15:141. doi:10.1186/1471-2164-15-141
- Wang Q and Holst J (2015) L-type amino acid transport and cancer: targeting the mTORC1 pathway to inhibit neoplasia. Am J Cancer Res.5(4): 1281–1294. PMID: PMC4473310
- Wargelius A, Fjelldal PG, Nordgarden U, Hansen T (2009) Continuous light affects mineralization and delays osteoid incorporation in vertebral bone of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) J Exp Biol, 212: 656-661; doi: 10.1242/jeb.024000
- Warrant EJ and Johnsen S (2013) Vision and the light environment. Current Biology 23(22): R990-R994. doi https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.10.019
- Wee P and Wang Z (2017) Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. Mok SC, ed. Cancers. 9(5):52. doi:10.3390/cancers9050052.
- Weger BD, Sahinbas M, Otto GW, et al. (2011) The Light Responsive Transcriptome of the Zebrafish: Function and Regulation. Mueller F, ed. PLoS ONE. 2011;6(2):e17080. doi:10.1371/journal.pone.0017080
- Won ET and Borski RJ (2013) Endocrine regulation of compensatory growth in fish. Frontiers in endocrinology 4: 74. doi 10.3389/fendo.2013.00074
- Wu S1, Li B, Lin H, Li W (2012) Stimulatory effects of neuropeptide Y on the growth of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). Gen Comp Endocrinol.179(2):159-66. doi: 10.1016/j.ygcen.2012.08.010
- Xu EG, Mager EM, Grosell M, Hazard ES, Hardiman G, Schlenk D (2017) Novel transcriptome assembly and comparative toxicity pathway analysis in mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*) embryos and larvae exposed to Deepwater Horizon oil. Sci Rep. 7:44546. doi:10.1038/srep44546
- Xu YQ, Zhang D, et al. (2012) Diurnal variation of hepatic antioxidant gene expression in mice. PLoS one 7(8): e44237. doi 10.1371/journal.pone.0044237
- Yacout SM and Gaillard ER (2017) The Anthocyanins, Oenin and Callistephin, Protect RPE Cells Against Oxidative Stress. Photochem Photobiol, 93: 590–599. doi:10.1111/php.12683
- Yamada H, Satoh R-I, Ogoh M, Takaji K, Fujimoto Y, Hakuba T, Chiba H, Kambegawa A, Iwata M (2002) Circadian changes in serum concentrations of steroids in Japanese char *Salvelinus leucomaenis* at the stage of final maturation. Zoo Sci.19 891–898. doi:10.2108/zsj.19.891
- Yang XO, Doty RT, Hicks JS, Willerford DM (2003) Regulation of T-cell receptor D beta 1 promoter by KLF5 through reiterated GC-rich motifs. Blood. 101(11):4492–4499
- Yuan L, Lv B, Zha J, Wang Z, Wang W, Li W, Zhu L (2013) New cytochrome P450 1B1, 1C1, 2Aa, 2Y3, and 2K genes from Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*): Molecular characterization, basal expression and response of rare minnow CYP1s and CYP2s mRNA exposed to the AHR agonist benzo[a]pyren. Chemosphere. 93(2):209-16. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.04.064
- Yue H, Li C, Du H, Zhang S, Wei Q (2015) Sequencing and De Novo Assembly of the Gonadal Transcriptome of the Endangered Chinese Sturgeon (*Acipenser sinensis*). PLoS ONE 10(6): e0127332. doi:10.1371/journal.pone.0127332
- Yúfera M, Perera E, Mata-Sotres JA, Calduch-Giner J, Martínez-Rodríguez G, Pérez-Sánchez J (2017) The circadian transcriptome of marine fish (*Sparus aurata*) larvae reveals highly synchronized biological processes at the whole organism level. Sci Rep. 7, 12943. doi:10.1038/s41598-017-13514-w



- Yunker WK, Smith S, et al. (2003) Endogenous hypothalamic somatostatins differentially regulate growth hormone secretion from goldfish pituitary somatotropes in vitro. *Endocrinology* 144(9): 4031-4041. doi 10.1210/en.2003-0439
- Yunker WK and Chang JP (2004) Somatostatin-14 actions on dopamine- and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-evoked Ca<sup>2+</sup> signals and growth hormone secretion. *Journal of neuroendocrinology* 16(8): 684-694. doi 10.1111/j.1365-2826.2004.01218.x
- Zhang Q, Huang WD, Lv XY, Yang YM (2011) Ghrelin protects H9c2 cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis through NF- $\kappa$ B and mitochondria-mediated signaling. *Eur J Pharmacol.* 654(2):142-9. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.12.011
- Zhao T, Liu C, Chen L (2015) Roles of Klf5 Acetylation in the Self-Renewal and the Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. Wu Q, ed. *PLoS ONE*.10(9):e0138168. doi:10.1371/journal.pone.0138168
- Zhenzhen X, Ling X, Dengdong W, et al. (2014) Transcriptome Analysis of the *Trachinotus ovatus*: Identification of Reproduction, Growth and Immune-Related Genes and Microsatellite Markers. Xiao J, ed. *PLoS ONE*. 9(10):e109419. doi:10.1371/journal.pone.0109419 dj3
- Zhu S, King SC, Haasch ML. (2006) Environmental induction of CYP1A-, CYP2M1- and CYP2K1-like proteins in tropical fish species by produced formation water on the northwest shelf of Australia. *Mar Environ Res.* 2006; 62 Suppl:S322–6. doi: 10.1016/j.marenvres.2006.04.058
- Zhu C, Pan Z, Wang H, Chang G, Wu N, Ding H (2017) De novo assembly, characterization and annotation for the transcriptome of *Sarcocheilichthys sinensis*. Schönbach C, ed. *PLoS ONE*.12(2):e0171966. doi:10.1371/journal.pone.0171966

#### 4. DISCUSIONES Y CONCLUSIONES GENERALES

Los mecanismos de percepción lumínica desarrollados por los organismos a través de la historia de la evolución (Reiter *et al.*, 2014; Rey y Reddy, 2015), indican que existe una estrecha relación entre la exposición a la luz, el estrés oxidativo y el control de los ritmos circadianos (D'Autréaux y Toledano, 2007; Nakanishi-Ueda *et al.*, 2013; Kuse *et al.*, 2014; Bodvard *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2017; Nakashima *et al.*, 2017; Ishii y Rohrer, 2017). Sin embargo, el vínculo entre el sistema antioxidante y la exposición a luz continua ha sido escasamente investigado en vertebrados (Wilking *et al.*, 2013; Giannetto *et al.*, 2014; Purushothaman *et al.*, 2015).

Las condiciones lumínicas son fuertes señales ambientales que sincronizan los ritmos circadianos en peces. En los que se observa una modulación directa de la luz sobre los procesos de alimentación, crecimiento y reproducción (Imsland *et al.*, 2007; Migaud *et al.*, 2010; Volkoff *et al.*, 2010; Pittman *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2015; Mata-Sotres *et al.*, 2015; Veras *et al.*, 2016; Takahashi *et al.*, 2016; Mata-Sotres *et al.*, 2016; Chi *et al.*, 2017; Espigares *et al.*, 2017). Estos conocimientos han permitido utilizar el fotoperiodo para retrasar el inicio de la madurez sexual, incrementar el crecimiento y reducir la alimentación en peces (Begtashi *et al.*, 2004; Melo *et al.*, 2014, Ammar *et al.*, 2015; Martins *et al.*, 2015; Volkoff, 2016; Espigares *et al.*, 2017).

Además, en diversos invertebrados acuáticos se ha observado que la luz puede influenciar la determinación sexual (Naylor *et al.*, 1988<sup>a,b</sup>; Hobaek y Larsson, 1990; Walker, 2005; Guler *et al.*, 2012) y recientemente en el pez atherinópsido *Leuresthes tenuis* se reportó que un fotoperiodo de 15 horas luz puede influir en la tasa de proporción sexual (Brown *et al.*, 2014). Al igual que *L. tenuis*, el pez blanco *Chirostoma estor* presenta una clara influencia de las



condiciones de temperatura sobre su determinación sexual (Corona-Herrera *et al.*, 2016).

En el presente trabajo se evaluó a nivel biométrico, histológico y molecular el efecto del fotoperiodo sobre los mecanismos de alimentación, crecimiento y determinación sexual en *C. estor*, bajo dos fotoperiodos con iluminación LED de amplio espectro: a) fotoperiodo de luz continua (CL) 24 horas luz y b) fotoperiodo simulado control (CS) de 12 horas luz/12 oscuridad.

Con respecto a la determinación sexual las evidencias histológicas en *C. estor* indican que el fotoperiodo de CL incrementa la proporción de machos con un 73.3% vs 40% en el fotoperiodo simulado control ( $p \leq 0.05$ ). Por lo que este trabajo aporta la primera evidencia de que un fotoperiodo de luz continua puede tener un efecto de masculinización en una especie de vertebrado.

Los análisis de expresión relativa de los transcritos del factor feminizante *foxl2* (Wang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2015) y del factor masculinizante *sox9* (Rodríguez-Mari *et al.*, 2005; Ijiri *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2010; Vizziano-Cantonnet *et al.*, 2016) no muestran diferencias significativas entre los tratamientos ( $p > 0.05$ ) en larvas de *C. estor*, a los 5 días post-eclosión (DPE). Estos resultados sugieren que al tiempo de muestreo, los niveles de expresión transcripcional se encuentran cercanos a su estado basal y no es posible observar diferencias significativas entre los tratamientos, por lo que es necesario realizar estudios futuros que incluyan el análisis de las muestras durante toda la ontogenia temprana para definir el periodo de la diferenciación sexual molecular de *C. estor*.

Aunado a la expresión de los factores feminizantes y masculinizantes, se observó una sobreexpresión significativa en los transcritos de las enzimas antioxidantes glutatión reductasa (*gsr*) y catalasa (*cat*) relacionadas con el control del estrés oxidativo (Giannetto *et al.*, 2014; Purushothaman *et al.*, 2015) en el tratamiento de CL vs CS ( $p \leq 0.05$ ). Los resultados indican que los transcritos de las enzimas *Cat* y *Gsr* relacionadas con el procesamiento del  $H_2O_2$  (Peróxido de hidrógeno) se encuentran en fase de activación y responden a probables condiciones de estrés oxidativo bajo las condiciones de iluminación continua en *C. estor*.

Para los transcritos de superóxido reductasa 2 *sod2* y proteína desacoplante 2 *ucp2* relacionados también con la respuesta ante estrés oxidativo (Krauss *et al.*, 2005; Vera *et al.*, 2014) no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ( $p > 0.05$ ). Debido a lo anteriormente expuesto la participación de *Sod2* y *Ucp2* no se encuentra clarificada, por lo que en futuros trabajos se debe de estudiar la expresión de los diferentes genes relativos al estrés oxidativo directamente en los tejidos (cerebro, hígado, gónada), a través de estadios de desarrollo (embrión, eclosión, larva), así como en diferentes condiciones de iluminación (fase oscura, fase luminosa, intensidad y longitudes de onda), que



permitan concluir cual es la participación del estrés oxidativo sobre los mecanismos de determinación sexual en *C. estor*.

Además, el transcripto del factor liberador de corticotropina (*crf*) relacionado con la activación del eje de estrés, muestra una sobreexpresión en condiciones de iluminación continua ( $p \leq 0.05$ ). Sin embargo, en los transcriptos del receptor de glucocorticoides *gcr1* no se observan diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre tratamientos. La falta de diferencias significativas de la expresión de *gcr1*, coincide con observaciones en larvas del pez cebra *D. rerio*, ya que no se observan cambios en la expresión del receptor de glucocorticoides cuando las larvas se exponen a tratamientos con Dexametasona (agonista de cortisol) o bajo condiciones de hipoxia (Wilson *et al.*, 2016). Incluso en tratamientos de cortisol en embriones del pez cebra tampoco se observan diferencias significativas entre la expresión de *gcr1* (Nesan y Vijayan, 2012). Lo que sugiere que *gcr1* no participa activamente en la respuesta de estrés durante etapas temprana del desarrollo en este tipo de especies.

Por otro lado la sobreexpresión de *crf* en larvas de *C. estor* sugiere la activación del eje de estrés. Además, provee evidencia de la correlación entre la respuesta al estrés y el efecto de la masculinización por fotoperiodo. Sin embargo, se requiere de mayores esfuerzos de investigación para conocer los niveles de la hormona cortisol y la expresión de otros genes relacionados con el proceso de masculinización en la gónada (Castañeda *et al.*, 2014), para poder obtener conclusiones definitivas de la participación del eje de estrés en la determinación sexual de *C. estor* bajo condiciones de iluminación continua, como ha sido descrito para otros atherinópsidos (Hattori *et al.*, 2009).

Las evidencias e ideas expuestas en el presente trabajo sobre los procesos de determinación/diferenciación sexual y la relación entre la exposición a factores ambientales con el estrés oxidativo, ofrecen sustento científico para formular algunas preguntas puntuales que ayuden a comprender mejor el fenómeno de la determinación sexual ambiental en vertebrados.

Primero, ¿Cual es la interacción entre los genes maestros de determinación sexual y el estrés oxidativo?. Segundo, ¿El estrés oxidativo modula el eje de estrés, el eje tiroideo y el eje de reproducción para masculinizar a los organismos?. Tercero, ¿Cual es el papel del estrés oxidativo en la diferenciación y apoptosis gonádica en vertebrados?. Cuarto, ¿Es posible producir una línea de organismos homogaméticos con un control total de la determinación sexual ambiental?. Quinto ¿Es posible modular la determinación/diferenciación sexual con otros factores que induzcan estrés oxidativo en los peces?. Para explorar estas hipótesis, se requiere de un mayor esfuerzo de investigación que permita comprender a profundidad los mecanismos moleculares que están detrás de la sensibilidad de los organismos a factores ambientales, lo cuales influyen los procesos de determinación/diferenciación y plasticidad sexual en vertebrados.



Con respecto al efecto del fotoperiodo sobre las variables biométricas de crecimiento, se observó que el tratamiento de CL incrementa de manera significativa ( $p \leq 0.05$ ) la masa corporal (66.14 %), la longitud estándar (17.95 %) y la tasa de crecimiento específico (10.34 %) de los organismos comparado con el tratamiento de CS. En otras especies de peces se ha reportado que un fotoperiodo de CL incrementa la masa (Nagasawa *et al.*, 2012; Ayala *et al.*, 2013; Handeland *et al.*, 2013; Martínez-Chávez *et al.*, 2014; Veras *et al.*, 2016), la disminuye (Aride *et al.*, 2006; Imsland *et al.*, 2013; Villamizar *et al.*, 2014) o no existe un efecto evidente (Villamizar *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2015).

La relación masa-longitud indica que los organismos exhiben un crecimiento alométrico positivo sin diferencias entre los tratamientos ( $p \geq 0.05$ ) es decir que para ambas condiciones existe una mayor ganancia proporcional de la masa con respecto a la longitud. En conjunto el factor de condición (K) indica que no existen diferencias significativas ( $p \geq 0.05$ ) entre los tratamientos. Los valores observados sugieren condiciones de bienestar general en los organismos mantenidos en ambos tratamientos y que la luz continua no afecta el factor de condición en la especie. En otros peces tampoco se ha reportado un cambio significativo del factor de condición por el uso del fotoperiodo (Karlsen *et al.*, 2006; Freitas *et al.*, 2009; Giannecchini *et al.*, 2012; Solomon y Okomoda, 2012; Aragón-Flores *et al.*, 2017).

El análisis de supervivencia en *C. estor* indica que no existen diferencias significativas entre los tratamientos ( $p \geq 0.05$ ), de manera similar en otras especies no se reportan diferencias entre tratamientos lumínicos (Ghomi *et al.*, 2011; Falahatkar *et al.*, 2012; Veras *et al.*, 2013; Veras *et al.*, 2016) y existen reportes donde se observa que la luz continua incrementa la mortalidad de los organismos (Ayala *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2015).

En las variables relacionadas a la alimentación en *C. estor*, como el consumo de alimento y el factor de conversión alimenticia (FCA) se presentan diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los tratamientos de CL y CS. Que indican un mayor consumo de alimento en luz continua pero una mejor conversión alimenticia. Similar a lo observado en *Salmo salar* (Nordgarden *et al.*, 2003) y que contrasta con lo reportado en otras especies donde se observa un incremento en el consumo de alimento y el FCA bajo un fotoperiodo de luz continua (Ghomi *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2015) o donde no se observa un efecto del fotoperiodo en estas variables (Falahatkar *et al.*, 2012; Veras *et al.*, 2013; Trejchel *et al.*, 2014).

Aunque la mayoría de los atributos biométricos de crecimiento y alimentación son positivos en *C. estor*, se presentan deformidades en la mandíbula, opérculo y columna vertebral de los organismos mantenidos en condiciones de iluminación continua comparados con peces del fotoperiodo simulado control ( $p \leq 0.05$ ), lo cual es comúnmente observado en otras especies (Wargelius *et al.*, 2009; Villamizar *et al.*, 2009; Blanco-Vives *et al.*, 2010; Villamizar *et al.*, 2014). Por lo tanto en futuros trabajos es necesario abordar y resolver esta



problemática ya que aunque no afecta la supervivencia, si puede afectar el desempeño y la funcionalidad de los organismos en cultivo.

De manera general se concluye que un fotoperiodo de luz continua puede ser aplicado para mejorar el crecimiento y la conversión de alimento, sin tener afectaciones en la supervivencia de embriones y larvas del pez blanco de Pátzcuaro (*C. estor*). Debido a estas observaciones se sugiere que la aplicación de un fotoperiodo de luz continua en *C. estor*, es una herramienta útil que permite disminuir los tiempos de crecimiento y aumentar la ganancia de peso sin afectar el bienestar general de los organismos. Sin embargo, se requiere de estudios posteriores para disminuir la presencia de deformidades músculo-esqueléticas en estos organismos y que permitan aplicar este tipo de fotoperiodo en la producción comercial de la especie.

Con relación a la presencia de hormonas circadianas melatonina y cortisol. Se advierte que no existen diferencias significativas ( $p \geq 0.05$ ) en los niveles de concentración de melatonina entre los tratamientos durante la fase diurna, debido a que la presencia de la luz inhibe la producción de Melatonina como se ha reportado en otras especies de peces (Martínez-Chávez *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2010; Bayarri *et al.*, 2010; Feng y Bass, 2016). Sin embargo, tampoco se observan diferencias significativas entre la fase luminosa y oscura en el tratamiento control (CS), donde normalmente en diversas especies de peces se reporta una mayor concentración de melatonina durante los periodos de oscuridad (Kalamarz *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2010; Muñoz-Perez *et al.*, 2016; Kulczykowska *et al.*, 2017; Rajiv *et al.*, 2017). Este último resultado en CS puede deberse a fallas de sensibilidad de los kits utilizados, por lo que los datos obtenidos en *C. estor* deben tratarse con precaución y se recomienda el uso de otras metodologías cromatográficas, para confirmar o descartar los resultados del presente trabajo.

Para el caso del perfil de cortisol, se observa un ritmo circadiano típico de organismos diurnos en el tratamiento de CS. Sin embargo, para los organismos mantenidos en luz continua existen ritmos ultradianos con niveles de cortisol por debajo de las concentraciones basales reportadas para CS y con diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre tratamientos. Por lo que en *C. estor* la luz continua parece no representar un efecto de estrés en estos organismos, como se observa en otras especies de peces expuestos en fotoperiodos de luz continua (Falahatkar *et al.*, 2012; Brüning *et al.*, 2015; Biswas y Takii, 2016).

En conclusión la aplicación del fotoperiodo de luz continua en el cultivo de *C. estor*, disminuye la producción de melatonina y modifica significativamente el perfil circadiano de la producción de cortisol, lo que indica una disrupción circadiana en estos organismos con respecto a los mantenidos en CS. Además, el fotoperiodo de CL no incrementa las concentraciones de cortisol, por lo tanto sugiere una alta plasticidad de los organismos para adaptarse, sobrevivir y crecer bajo estas condiciones lumínicas.



Por otro lado el transcriptoma *De Novo* realizado en *C. estor*, presenta un total de 68,960 contigs únicos, anotados en 43,314 proteínas. El análisis de enriquecimiento en términos de GO indica que 126,929 términos se encuentran involucrados en procesos biológicos, 98,712 pertenecen al rubro de componentes celulares y 36,670 presentan una función molecular. El análisis Kegg indica la anotación de 791 genes involucrados en rutas metabólicas primarias, 224 en rutas secundarias y la identificación de 383 procesos biológicos.

Los valores del porcentaje de anotación, el análisis de enriquecimiento GO y Kegg, en conjunto con la longitud promedio de los contigs (787 pb) y el N50 (1324 pb). Indican que el transcriptoma de *C. estor* se encuentra dentro de los parámetros reportados para otros transcriptomas *De Novo* en peces (Vidotto *et al.*, 2013; Aedo *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014; Zhenzhen *et al.*, 2014; Yue *et al.*, 2015; Bain *et al.*, 2015; Fang *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2016<sup>a</sup>; Chatchaiphan *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2017; Lu *et al.*, 2017; Malachowicz *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2017).

La caracterización transcriptómica de *C. estor*, provee una cantidad abundante de información genómica y herramientas moleculares básicas de alta calidad en el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*. Por lo tanto se abre la oportunidad para el desarrollo de una multiplicidad de futuros trabajos, involucrados en la determinación de la expresión de genes específicos, según sea el interés de cada investigación particular (Crecimiento, alimentación, reproducción, metabolismo, respuesta inmune, mecanismos moleculares, etc.). Además, al ser uno de los primeros transcriptomas realizados para la familia Atherinopsidae junto con los reportados para los pejerreyes (Hughes *et al.*, 2017) ofrece la oportunidad de realizar comparaciones genómicas evolutivas con los organismos de esta y otras familias de peces o vertebrados.

El análisis de expresión diferencial indica que 169 transcritos se encuentran diferencialmente expresados ( $p < 0.05$ ), de los cuales 141 transcritos presentan bajos niveles de expresión y solamente 28 transcritos exhiben altos niveles de expresión en el tratamiento de luz continua. Esto indica una represión a nivel transcripcional por efecto de la luz, como se observa en otras especies de peces y vertebrados (Fukuhara y Tosini, 2008; Bayle *et al.*, 2009; Ben-Moshe *et al.*, 2014).

Del total de transcritos diferencialmente expresados, 115 presentan anotación funcional, 22 tienen anotación ambigua y 11 son secuencias no descritas en las bases de datos. El análisis de enriquecimiento en términos de GO y Kegg revela que el tratamiento de luz continua disminuye la expresión de genes relacionados con las actividades de fototransducción, transporte de vesículas sinápticas, metabolismo de purinas, transporte transmembranal iónico, ácido carboxílico y aminoácidos, entre otros. Además, los genes que presentan altos niveles de expresión en el tratamiento de CL están involucrados principalmente



con las funciones biológicas de ritmos circadianos, metabolismo central, crecimiento y sistema inmune innato.

En otras especies de peces también se ha reportado que la luz incide sobre la regulación metabólica (purinas, lípidos, aminoácidos, xenobióticos, etc.), la regulación de actividades de fototransducción, estrés oxidativo, ritmos circadianos, modulación de la transcripción, proteólisis, mecanismos epigénéticos, apoptóticos y sistema inmune, entre otros (Bonnet *et al.*, 2007; Toyama *et al.*, 2009; Gavriouchkina *et al.*, 2010; Weger *et al.*, 2011; Amaral y Johnston, 2012; Nagasawa *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013; Ben-Moshe *et al.*, 2014; Giannetto *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015<sup>a</sup>; Koop *et al.*, 2015; Martins *et al.*, 2015; Purushothaman *et al.*, 2015; Khan *et al.*, 2016; Boyle *et al.*, 2017; Carmona-Antoñanzas *et al.*, 2017; Yufera *et al.*, 2017).

Es interesante que para la mayoría de los genes modulados globalmente por el fotoperiodo en *C. estor*, no existen reportes anteriores del efecto de la luz continua sobre su expresión, ya que no son los genes clásicos para los ciclos circadianos, el crecimiento, la activación del sistema inmune y el estrés oxidativo reportados en la literatura. Por lo que se amplía el panorama para desarrollar futuros trabajos sobre los perfiles circadianos de expresión para estos genes involucrados en una multiplicidad de funciones biológicas que regulan el desarrollo de los peces y probablemente de otros vertebrados.

Las múltiples evidencias de los procesos biológicos afectados indican una modulación directa de la luz sobre las actividades relacionadas con la mitocondria. En recientes trabajos se ha propuesto que este orgánulo cumple funciones medulares para el control de los ritmos circadianos, el estrés oxidativo, la producción de cortisol, la alimentación, el sistema inmune, el crecimiento celular, la apoptosis y la regulación epigenética, entre otras funciones (Horvath *et al.*, 2003; Emre y Nübel, 2010; Jou *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Shaughnessy *et al.*, 2014; Calebiro *et al.*, 2014; Tadic *et al.*, 2014; Toda y Diano, 2014; Nasrallah y Horvath *et al.*, 2015; Castegna *et al.*, 2015; Khan *et al.*, 2015; Barnstable *et al.*, 2016; Leone *et al.*, 2017).

Sin embargo, en los peces la relación entre la exposición a diferentes fotoperiodos y la participación de la mitocondria en la regulación de las funciones fisiológicas no se ha explorado ampliamente. Las herramientas moleculares desarrolladas en el presente trabajo ofrecen una aproximación para el desarrollo de futuros trabajos que aborden esta temática y puedan definir cual es la participación de la mitocondria en la regulación de los mecanismos asociados al crecimiento, la alimentación y la determinación sexual del pez blanco *C. estor*.

En conjunto estos resultados demuestran por primera vez a nivel transcriptómico los efectos globales del uso de luz continua en un pez teleosteo. También sugieren de manera general que las diferentes condiciones lumínicas no afectan la supervivencia de los organismos de manera negativa.



Además, demuestran que el fotoperiodo de CL puede funcionar como un disruptor circadiano que permite modular la ganancia en peso de manera positiva, que mejora la conversión alimenticia, que es capaz de modular la expresión de genes y favorece el crecimiento en organismos mantenidos bajo condiciones de luz continua.

Las evidencias biométricas, histológicas y moleculares sugieren que el uso de un fotoperiodo de luz continua con iluminación LED, desde la etapa de fertilización, incide de manera significativa en el desarrollo biológico general de *C. estor*. Que afecta los ejes de crecimiento y alimentación, así como la determinación sexual a través de mecanismos complejos relacionados con el estrés oxidativo. Los cuales deben ser abordados desde múltiples enfoques para conocer sus particularidades y así tener una mayor comprensión a diferentes niveles de la plasticidad biológica de estos peces ante condiciones de iluminación constante.

Finalmente, las herramientas moleculares presentadas en este trabajo, aportan información científica de vanguardia, que sin duda potenciará nuevas investigaciones para incrementar el conocimiento de los efectos del fotoperiodo sobre el crecimiento, alimentación, supervivencia y determinación sexual, que a su vez servirán de base para el desarrollo de un paquete biotecnológico de cultivo en el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*.



## APÉNDICE A. PERFIL METABOLÓMICO CUALITATIVO Y CUANTITATIVO POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DEL PEZ BLANCO DE PÁTZCUARO *Chirostoma estor*

### A1. Metodología para la obtención de metabolitos y análisis de resonancia magnética nuclear

Además de efectuar los trabajos relacionados a los objetivos planteados en el presente proyecto de doctorado, se realizaron estudios por la técnica de resonancia magnética nuclear (NMR) en el centro de análisis químicos, investigación y entrenamiento de la Memorial University en Newfoundland, Canadá. Con el fin de obtener un perfil metabolómico cualitativo y cuantitativo de los peces blancos mantenidos bajo los tratamientos de fotoperiodo simulado control (CS) y luz continua (CL).

Para este análisis de NMR se obtuvieron muestras de peces de los tratamientos: CS (n=3) y CL (n=3) durante la fase lumínica (12:00 pm) a las 12 SPE. Los organismos fueron sedados con agua helada y fueron colocados inmediatamente en Nitrógeno líquido, para después almacenarlos a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Posteriormente se obtuvo su masa húmeda y se sometieron a condiciones de liofilización ( $-50^{\circ}\text{C}$ ) durante 24 horas. Una vez finalizado este proceso se obtuvo su masa seca y se procedió a diseccionar las cabezas del pez blanco para realizar el paso de extracción con los solventes de Metanol:Cloroformo:Agua (Ching *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2008).

Inicialmente se obtuvo la masa seca de las cabezas diseccionadas y se colocaron en un sistema automático de homogenización Precellys (precellys.com) a 5000 rpm durante 15 segundos. Posteriormente se agregaron 4 ml de metanol y 1.6 ml de agua grado HPLC (por cada gramo de masa humedad "gwm"). Consecutivamente se homogenizaron las muestras a 6500 rpm durante 15 segundos, al finalizar se adicionaron 4 ml de cloroformo y 2 ml de agua HPLC (gwm). Después se colocaron en un homogenizador orbital (30-60 seg), se incubaron en hielo por 10 minutos y se llevó a cabo la separación de la fase polar por centrifugación refrigerada (2000 x g) durante 5 minutos (Ching *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2008) (Figura 46).

La fase polar fue colocada en un evaporador centrífugo a temperatura ambiente durante 60-180 minutos, una vez obtenida la fase polar sin presencia de solventes se procedió a rehidratar la muestra con 600  $\mu\text{l}$  de buffer de fosfatos ( $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) disuelto en agua deuterizada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) a pH 7.3 (Schock *et al.*, 2013). A la mezcla se le adicionó el compuesto de referencia para NMR tetrametilsilano TMS (Hoffman, 2006) a una concentración de  $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Las muestras rehidratadas y homogenizadas se utilizaron para realizar los análisis de espectroscopia de protones NOESY ( $^1\text{H}$ -1D), la espectroscopia correlacionada de protones COSY ( $^1\text{H}$ -2D) y la espectroscopia correlacionada cuántica simple heteronuclear HSQC de protones y carbonos ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) (Figura 46).



Los estudios de metabolómica por NMR fueron realizados en un espectroscopio Bruker de 500 megaHertz (Mhz) con ayuda del programa de operación Topspin 1.3 ([www.bruker.com](http://www.bruker.com)). La espectroscopia de protones NOESY en 1 dimensión ( $^1\text{H}$ -1D) se realizó con el método noesygppr1d (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy). Este método permite medir la dinámica molecular de los protones incluyendo el efecto de la distancia entre los mismos para investigar la conformación y determinar la proximidad de sistemas de espines adyacentes (Kaltschnee *et al.*, 2016).

En este método se aplican pulsos en gradiente (pulsos de radiofrecuencia (RF) electromagnética heterogéneos durante cortos periodos de tiempo que aumentan la resolución del espectro de NMR). Los pulsos se realizaron en condiciones de presaturación (supresión de la señal del solvente) durante el tiempo (500-900 milisegundos) de mezcla de intensidades de los pulsos de RF, así como en el tiempo de relajación (1-5 segundos) de los protones en el eje Z (T1) y el eje X,Y (T2). Para obtener el espectro se adquirieron 65,536 puntos de datos en 64 lecturas a través del espectro de cambio químico respecto a la frecuencia (Hertz/MegaHertz) de 12.01 (ppm) expresado en partes por millón (Harris *et al.*, 2001).

Para el caso de la espectroscopia homonuclear correlacionada de protones COSY ( $^1\text{H}$ -2D) en 2 dimensiones se utilizó el método cosygppf2D (COrrrelation Spectroscopy). Este método permite determinar los valores absolutos de la interacción entre los protones (escalar “J” coupling) a través de sus enlaces químicos que dependen de la interacción entre sus espines nucleares y los espines de los electrones de enlace (Roberts, 2013). En este método también se aplican pulsos en gradiente de RF con condiciones de presaturación durante el tiempo de relajación (1-5 s) de los protones (T1 y T2), el espectro se obtuvo mediante 64 lecturas con 2048 puntos de datos para 12.01 ppm.



**Figura 46.** Proceso de extracción de metabolitos por el método de Metanol:Cloroformo:Agua para análisis de resonancia magnética nuclear en el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*.



Por otro lado el experimento de espectroscopia correlacionada cuántica simple heteronuclear HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) de protones y carbonos ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ), puede determinar la correlación de las frecuencias estrechas de resonancia entre los pares de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ . En la muestras de pez blanco se aplicó el método (hsqcedetgpsisp2.2) el cual aplica pulsos intermitentes de RF que cambian las características térmicas de la muestra con el fin de desacoplar químicamente los pares  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ . Por lo que requiere de un gran número de lecturas y es muy sensible a las condiciones de temperatura e imperfecciones de los pulsos de RF (Ganten and Ruckpaul, 2006). En este método se asumió un tiempo de relajación de (1-5 s) y un tiempo inter-pulsos de (3.45 ms), el espectro se obtuvo mediante 64 lecturas con 2048 puntos para 12.01 ppm en el eje de los protones  $^1\text{H}$  y 180 ppm en el eje de los carbonos  $^{13}\text{C}$  (Shock *et al.*, 2013).

Para obtener las líneas del espectro de alta resolución se adquirieron los valores FID (Free Induction Decay) (Hollas, 2005). La señal es dependiente del tiempo y es generada por los espines nucleares magnetizados en desequilibrio (cambio de la orientación del eje de rotación o precesión de Larmor alrededor del campo magnético aplicado). La cual es inducida por el pulso resonante de radiofrecuencia electromagnética cercana a la frecuencia de Larmor de los espines nucleares (Hopf *et al.*, 2010).

Para mejorar la señal de los picos espectrales sobre el ruido de fondo, se multiplicó los valores de FID por el exponencial LBF (line broadening factor, que minimiza la amplitud del pico de frecuencia de los protones debida a la interacción entre los espines nucleares y los electrones de otros átomos contiguos) con un valor de 0.3 Hertz ([www.bruker.com](http://www.bruker.com)). Posteriormente a los datos se les aplicó una transformación de Fourier (FT), que básicamente transforma el conjunto de todas las frecuencias de resonancia de los diferentes protones en una sola línea de espectro, con corrección automatizada de la línea base y de la fase de la onda (Schock *et al.*, 2013).

El método de corrección incluye valores de orden cero PHC0 (0 a 360 grados no dependiente de la frecuencia de la onda) que es aplicada a todos los picos del espectro. Además de una corrección de fase de primer orden PHC1 (función lineal proporcional a la frecuencia de la onda) y es dependiente de las distorsiones de la fase (cambio del entorno químico de los protones debido al movimiento orbital de los electrones de los enlaces). Con ambas correcciones PHC0 y PHC1 se obtienen las ondas de los protones ( $^1\text{H}$ ) en fase para graficar el espectro final ([www.bruker.com](http://www.bruker.com)).

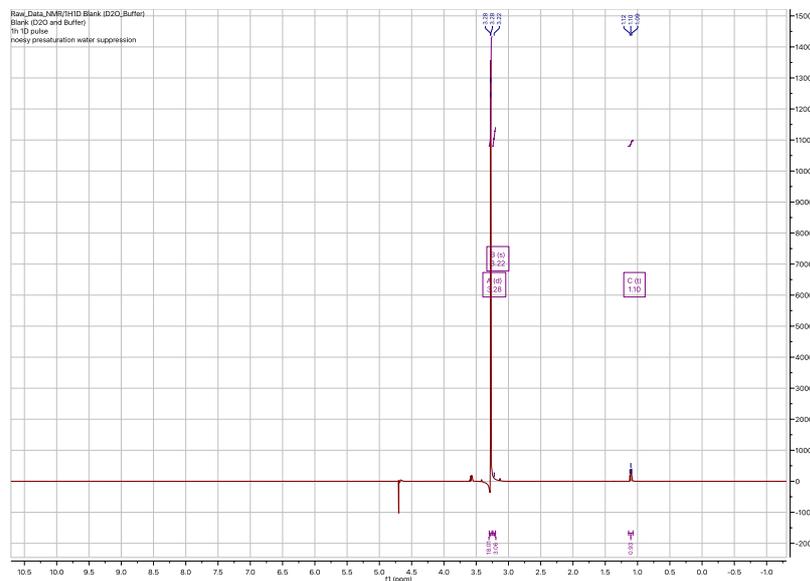
Las gráficas obtenidas de los tres diferentes experimentos de espectroscopia NMR fueron analizados con el programa Mestrenova 10.0 ([www.mestrelab.com](http://www.mestrelab.com)). Con este programa se realizó la corrección manual de la línea base y de la fase de onda, así como los análisis de interacción de protones (J-coupling), las integraciones de las áreas bajo la curva y la comparación cualitativa de los picos espectrales de los experimentos de



NOESY ( $^1\text{H}$ -1D) y COSY2D ( $^1\text{H}$ -2D). Para la comparación estadística cuantitativa de NOESY se utilizó el programa Metaboanalyst 3.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/faces/home.xhtml>) y para la identificación de metabolitos se utilizó el programa Chenomx NMR suite 8.3 (<https://www.chenomx.com/>). Para el caso del experimento HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) únicamente se realizó la visualización de la gráfica del espectro con el programa Mestrenova 10.0.

## A2. Resultados de los análisis de resonancia magnética nuclear

El primer paso para obtener el perfil metabolómico cualitativo fue realizar pruebas preliminares para estandarizar el protocolo de extracción de metabolitos. Una vez estandarizada la extracción con el método Metanol:Cloroformo:Agua, se colocaron las muestras en el espectroscopio para realizar la estandarización de los métodos experimentales de NMR. Con el método de noesyppr1d estandarizado, se realizó la medición de una muestra blanco que solo contenía el buffer de fosfatos disuelto en agua deuterizada ( $\text{D}_2\text{O}$ ). En la Figura 47 se observa el espectro (Transformada de Fourier) con análisis de los picos espectrales (protones) en 1.09, 1.10, 1.12, 3.13, 3.22, 3.28 y 3.42 ppm (Hertz/Megahertz de frecuencia), así como las integrales del área bajo la curva de cada pico reportado. El pico suprimido alrededor de 4.65 ppm corresponde a la supresión del agua deuterizada.

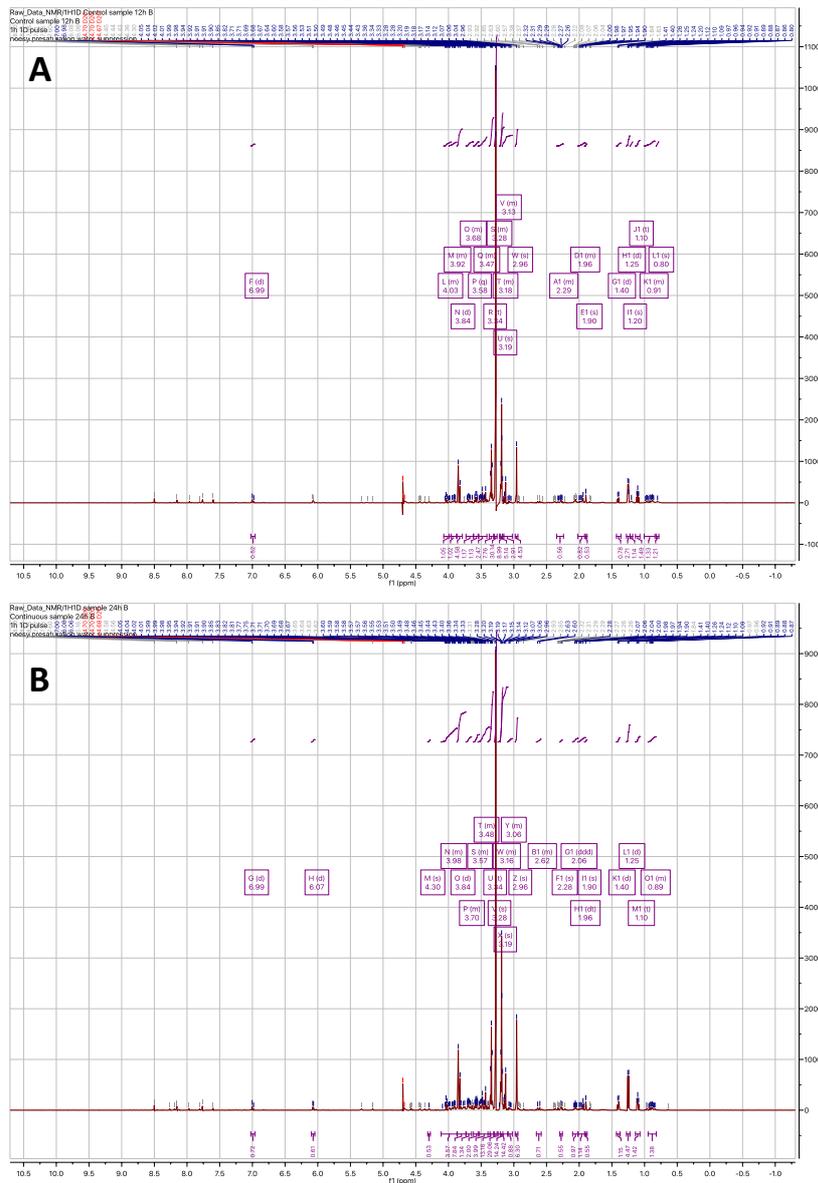


**Figura 47.** Espectro  $^1\text{H}$ -1D NMR con análisis de picos espectrales e integrales del disolvente de buffer de fosfatos y agua deuterizada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) utilizado como disolvente en las muestras del pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*.

Una vez que se comprobó los picos del espectro del disolvente, que indica la ausencia de contaminantes en el buffer preparado. Se procedió a realizar las mediciones de espectroscopia en las muestras ( $n=3$ ) del fotoperiodo simulado control (CS) y en las muestras ( $n=3$ ) del fotoperiodo de luz continua (CL).

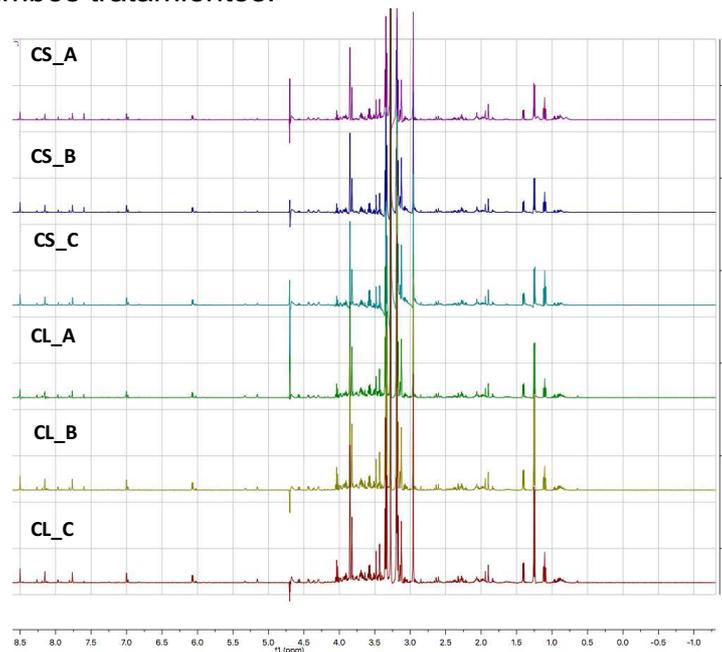


Las muestras de CS presentaron un total de 83, 113 y 87 picos catalogados como compuestos para las muestras CS\_A, CS\_B y CS\_C respectivamente. Las muestras del tratamiento de CL presentan 110, 116 y 111 picos catalogados como compuestos en las muestras CL\_A, CL\_B y CL\_C respectivamente (Tabla 22). En la Figura 48, se observa el ejemplo de dos espectros con análisis de picos espectrales, así como las integrales de las áreas bajo la curva. La parte superior de la figura (A) corresponde a una muestra del tratamiento CS y la parte inferior (B) corresponde a un espectro del tratamiento de CL.





Con los espectros obtenidos de las muestras de CS y CL, se procedió a realizar una comparación gráfica entre las muestras, para observar si existían diferentes patrones diferenciales cualitativos de los picos espectrales entre los tratamientos. En la Figura 49, se observan las tres muestras para el tratamiento control (parte superior de la gráfica) y las tres muestras para el tratamiento de luz continua (parte inferior de la gráfica). Como se distingue en la Figura 49, no existen diferencias a nivel visual en los espectros de las diferentes muestras. Estos resultados sugieren que no existen cambios significativos en los perfiles cualitativos de los espectros obtenidos por el método de  $^1\text{H}$ -1D NMR para las muestras de ambos tratamientos.



**Figura 49.** Comparación cualitativa de espectros  $^1\text{H}$ -1D NMR en el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*. Muestras del fotoperiodo simulado control (CS\_A, CS\_B y CS\_C); Muestras del fotoperiodo de luz continua (CL\_A, CL\_B y CL\_C).

Debido a los resultados obtenidos en el perfil cualitativo se procedió a realizar un análisis estadístico cuantitativo con las intensidades de los picos espectrales con el programa Metaboanalyst 3.0. En la Tabla 22 se observan los valores de los picos y las intensidades utilizadas para cada una de las muestras. Cabe mencionar que a pesar de que las muestras contienen un mayor número de picos espectrales, en el análisis cuantitativo solo fueron utilizados aquellos que fueron catalogados como posibles compuestos por el programa Mestrenova 10.0.

El análisis estadístico realizado indica que las muestras (n=6) contienen en total 620 picos espectrales con un promedio de 103.3 picos por muestra. El programa agrupó los picos en 54 grupos, en cada grupo identificado los picos fueron sumados para realizar un agrupamiento de intensidades por cada muestra. Los picos que aparecen en menos de la mitad de las muestras para cada tratamiento fueron ignorados en el análisis estadístico correspondiente.



Tabla 22. Valores de intensidad de los picos espectrales <sup>1</sup>H-1D NMR utilizados para el análisis estadístico cuantitativo en el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*.

No	CS_A		CS_B		CS_C		CL_A		CL_B		CL_C	
	ppm	Intensidad										
1	7	80.8			7	87.2	7	91.6	7	82.5	7	124.4
2	6.98	39.4	6.98	35.6	6.98	35.7	6.98	30.7	6.98	42.6	6.98	37.8
3	4.05	25.7	4.29	32.5	4.05	27.6	6.08	63.7	6.08	94	6.08	91.8
4	4.04	120.2	4.05	26.1	4.04	134.3	6.06	56.3	6.06	92.8	6.06	90.3
5	4.02	70.7	4.04	122.6	4.02	83.2	4.3	31.8	4.04	291.1	4.05	67.2
6	4.01	24.6	4.02	71.7	4.01	25.1	4.09	7.7	4.02	205	4.04	286.3
7	3.99	29.9	4.01	23.6	3.9901	30.6	4.05	40.2	4.01	67.1	4.02	200.6
8	3.98	23.2	4	10	3.99	27.7	4.04	176.5	3.9901	43	4.01	64.6
9	3.97	9.4	3.9901	29.8	3.9801	35.6	4.02	113.1	3.99	33.9	4	13
10	3.94	40.3	3.99	24.6	3.98	19.1	4.01	38.5	3.9801	40.3	3.9801	48.3
11	3.93	14.9	3.9801	32.7	3.97	18.9	4	13.3	3.98	19	3.99	30.8
12	3.92	33.2	3.98	17	3.95	12.5	3.9901	43.5	3.9501	19.3	3.9801	41
13	3.9101	36.3	3.97	15.4	3.94	37.1	3.99	28.1	3.95	53.8	3.98	22.1
14	3.91	45.3	3.95	40.2	3.93	18.6	3.9801	38.4	3.94	39.2	3.95	50.1
15	3.9	40.3	3.94	27.7	3.92	42.6	3.98	18	3.93	22.2	3.94	36.1
16	3.85	899.8	3.95	100.6	3.9101	42	3.97	16	3.92	57.7	3.93	22.6
17	3.82	420	3.92	41.7	3.91	70.4	3.96	7.8	3.9101	60.9	3.92	55.2
18	3.81	14.5	3.9101	41.9	3.9	59.7	3.95	39.5	3.91	88.7	3.9101	60.4
19	3.7101	25.1	3.91	61.8	3.88	16.1	3.94	19.8	3.9	67.6	3.91	86.6
20	3.71	44.7	3.9	50	3.85	107.3	3.93	14.1	3.88	17.3	3.9	68.3
21	3.69	77.1	3.88	15.6	3.83	17	3.92	35.2	3.85	1756.6	3.85	1683.3
22	3.68	53.9	3.85	100.6	3.82	451.9	3.9101	100.5	3.83	3.83	3.83	3.83
23	3.67	33.6	3.83	16.9	3.81	29.7	3.91	55.5	3.82	827.6	3.82	806.1
24	3.64	40.3	3.82	434.9	3.7101	22.7	3.9	45	3.81	50.7	3.81	55.1
25	3.6	61.4	3.81	29.1	3.71	42.4	3.88	11.2	3.8	23	3.8	27
26	3.58	128.4	3.7101	23.5	3.7	26	3.85	1163.3	3.7101	44.5	3.7101	47.1
27	3.57	133.3	3.71	44.4	3.69	62.1	3.83	23.4	3.71	70.2	3.71	74.3
28	3.56	51.1	3.69	73.9	3.6801	47.1	3.82	812.4	3.7	57	3.7	49.2
29	3.53	26.5	3.6801	50.1	3.68	40.8	3.81	42.9	3.69	88.2	3.69	100.5
30	3.51	59	3.68	36.5	3.67	30.7	3.77	27.1	3.6801	77.1	3.6801	69.4
31	3.5	35.9	3.67	36.6	3.65	11.7	3.75	36.3	3.68	53.6	3.68	58.1
32	3.49	57.3	3.65	7.6	3.64	58.2	3.7101	34.8	3.67	45.5	3.67	38
33	3.48	234.8	3.6401	13.9	3.63	15.4	3.71	65.1	3.66	44.4	3.66	41
34	3.46	22.3	3.64	48.7	3.62	10.7	3.7	39.6	3.6501	22.8	3.6501	24.8
35	3.45	34.1	3.63	13.4	3.6	78.9	3.69	76.2	3.65	15.6	3.65	15.1
36	3.44	51.6	3.62	9.2	3.59	21.9	3.68	59.3	3.64	95.4	3.64	97.9
37	3.43	241.4	3.6	54.5	3.58	201.2	3.67	34.6	3.63	25.8	3.63	28.8
38	3.36	560.4	3.59	28	3.57	205.2	3.6	61.2	3.62	23	3.62	21.7
39	3.34	1225.5	3.58	126.2	3.56	85.7	3.59	55.2	3.5	71.2	3.5	71.2
40	3.33	780.7	3.57	131.2	3.53	23.4	3.5801	116.9	3.59	49.2	3.59	53.7
41	3.2	789.1	3.56	49.4	3.51	56.2	3.58	24.3	3.58	141.9	3.58	174.1
42	3.19	2358.7	3.5501	11.5	3.5	44.4	3.5701	127.8	3.5702	12.2	3.5701	187.7
43	3.18	471.8	3.55	10.5	3.49	36.6	3.57	70.9	3.5701	147.1	3.57	51.9
44	3.17	503.1	3.53	23.8	3.48	289.3	3.56	81.7	3.57	44.6	3.56	41.2
45	3.16	32.8	3.51	54.8	3.46	31.9	3.5501	29.7	3.5601	59	3.5501	62.1
46	3.14	140	3.5	38.9	3.45	40.6	3.55	11.6	3.56	51.5	3.55	15.1
47	3.12	527	3.49	42.8	3.44	46.6	3.53	32	3.53	35.9	3.53	31.4
48	3.09	31.6	3.48	239.5	3.43	293.4	3.51	65.9	3.51	87.7	3.51	82.4
49	3.07	53.6	3.46	23.6	3.36	610.5	3.5	79.7	3.5	52.5	3.5	49
50	3.06	27.2	3.45	37.9	3.34	1455	3.49	92	3.49	82.2	3.49	68.5
51	3.04	19.6	3.44	51.3	3.33	958.9	3.4801	230.7	3.48	361.5	3.48	356.6
52	2.96	1338.1	3.43	288.5	3.2	762.4	3.48	26.3	3.47	16	3.46	40.4
53	2.32	27.6	3.37	6.1	3.19	1769.6	3.46	53.5	3.46	43.9	3.45	58.1
54	2.31	27	3.36	566.4	3.18	1618.7	3.45	54	3.45	59.6	3.44	69.2
55	2.2901	27.9	3.34	1294.6	3.17	641.3	3.44	60.9	3.44	70.4	3.43	454.2
56	2.29	22.9	3.33	874.3	3.16	311.5	3.43	341	3.43	463.4	3.4101	59.5
57	2.27	27.8	3.32	19.3	3.15	73.2	3.4	45	3.4101	49.7	3.41	9.2
58	2.26	38.1	3.26	50.9	3.14	162.2	3.39	13.9	3.41	12.7	3.4	57.9
59	2	22.6	3.2	757.1	3.12	688.2	3.3801	19.3	3.4	53.4	3.39	18.1
60	1.98	28.2	3.19	2163.1	3.09	39.7	3.38	13.7	3.39	15.1	3.3801	19.1
61	1.97	25.6	3.18	901.6	3.0701	53.3	3.37	19.3	3.38	15.1	3.38	17.9
62	1.95	14.9	3.17	692	3.07	13.7	3.36	716.9	3.37	15.3	3.37	19.1
63	1.94	106	3.16	47.4	3.06	30.3	3.34	1628.6	3.36	876.5	3.36	882.2
64	1.92	9.1	3.15	94.7	3.04	30.6	3.33	1057.2	3.34	2016.5	3.34	1996.9
65	1.9	192.6	3.14	158.3	2.96	1626.8	3.2	1006.8	3.33	1300.1	3.33	1310.2
66	1.41	115.8	3.12	659.9	2.32	31.6	3.1901	3293.6	3.2	1205.5	3.2	1213.8
67	1.4	127.1	3.11	8.9	2.31	28.4	3.19	8.9	3.1901	4245.5	3.1901	326.9
68	1.38	13.4	3.09	37.7	2.2901	24.9	3.17	689.1	3.19	1246.3	3.19	1538.3
69	1.26	440.6	3.07	55.8	2.29	21	3.15	130.5	3.17	852	3.17	826.2
70	1.25	93.2	3.06	34.2	2.28	56.8	3.14	186.2	3.16	59.6	3.1601	30.3
71	1.24	407.7	3.05	13.9	2.27	34.4	3.12	739.3	3.15	145.6	3.16	40.8
72	1.2	44.4	3.04	23.7	2.2601	29.9	3.11	1.94	3.14	225.6	3.1501	21.7
73	0.99	13.5	2.96	1523.7	2.26	43.7	3.09	34.3	3.09	56.5	3.15	88.2
74	0.97	41.7	2.82	6.8	2.07	18.4	3.07	51.3	3.07	78.8	3.14	227.2
75	0.96	40.4	2.6301	41.1	2.06	60.7	3.06	38.7	3.06	48	3.12	799.1
76	0.94	17.8	2.63	14.6	2.05	22	3.05	19.8	3.05	23.1	3.09	56
77	0.92	42.3	2.6	48	2.04	22.1	3.04	28.5	3.04	36.1	3.07	69.5
78	0.91	40	2.29	21.1	1.98	26.2	2.96	1841.2	2.96	262.3	3.06	37.4
79	0.89	23.3	2.28	59.7	1.97	22.9	2.82	7.8	2.64	86.3	3.04	37.2
80	0.88	48.9	2.27	30.9	1.95	12.2	2.6301	49.5	2.63	17	2.96	2638.7
81	0.87	30.6	2.2601	32.4	1.94	106.3	2.63	16.7	2.6	76.4	2.64	63.3
82	0.86	19.1	2.26	33.8	1.92	8.7	2.6	58.9	2.58	13.4	2.63	17.3
83	0.8	30.1	2.23	14.3	1.41	144.5	2.28	66.5	2.57	14.8	2.6	74.9
84			2.22	29.6	1.4	153.7	2.08	18.8	2.32	80	2.32	79.2
85			2.2	17.5	1.38	17.7	2.0701	10.7	2.31	48.4	2.31	45.3
86			2.08	13.8	1.26	487.2	2.07	30.1	2.2901	38	2.2901	35.1
87			2.07	22.3	1.24	475.9	2.06	58	2.29	31.3	2.29	31.5
88			2.06	57.7			2.0501	21.4	2.28	74.6	2.28	77.1
89			2.05	20.1			2.05	17.5	2.2701	37	2.27	42.1
90			2.0401	14.1			2.04	26.7	2.27	27.1	2.2601	40.8
91			2.04	23.6			2	29.2	2.2601	47.3	2.26	46.9
92			2.01	8.9			1.98	29.5	2.26	43.1	2.07	43.2
93			2	23.6			1.97	29.4	2.08	18.8	2	36.1
94			1.96	25.1			1.95	14.1	2.07	40.6	1.96	35.3
95			1.95	14.2			1.94	110.9	2.06	50.9	1.97	37.5
96			1.95	14.2			1.92	17.1	2.0501	25.1	1.95	20.2
97			1.94	100			1.9	176.3	2.05	20.1	1.94	133.6
98			1.92	6.7			1.41	161.7	2	33.9	1.9	223.8
99			1.41	130.4			1.4	178	1.98	32.1	1.41	244
100			1.4	147.7			1.26	691.9	1.97	32	1.4	258.1
101			1.38	18.4			1.24	685.7	1.96	22	1.26	

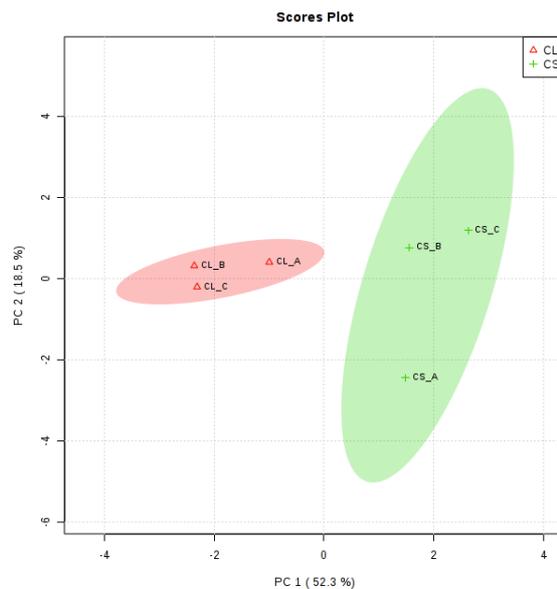


Con ayuda del programa se realizó un filtro de los datos para identificar y remover las variables no deseables en el modelado matemático. El método utilizado para las muestras fue el de rangos intercuartiles (IQR), el cual remueve los valores que se encuentran constantes entre las muestras y de esta manera se enfoca en los valores que presentan cambios entre los tratamientos.

Posterior al paso de filtrado se realizó un proceso de normalización de los datos para ajustar las diferencias entre las variables de las muestras. Los datos fueron normalizados con los valores de la media, para luego ser transformados con la función logarítmica (log). Posteriormente fueron escalados con el método de escala por intervalos, el cual permite comparar los metabolitos relativos al intervalo de la respuesta biológica, asumiendo que todos los metabolitos presentes en la muestra son igualmente importantes.

Como primer resultado del análisis estadístico se obtuvo la gráfica de componentes principales (PCA). El análisis realiza una transformación lineal del conjunto de valores de variables posiblemente correlacionadas en valores de variables sin correlación lineal (componentes principales) con la preservación de la varianza de los datos originales.

En la Figura 50, se distinguen dos conjuntos distintos correspondientes a los tratamientos de CS y CL. Esto muestra que los valores de intensidad de los 54 grupos de picos espectrales presentan una similitud por efecto de cada tratamiento analizado. Lo que sugiere una mayor similitud de la intensidad entre las muestras del tratamiento de luz continua (CL), mientras que el tratamiento de fotoperiodo simulado (CS), presenta mayores puntos de dispersión en la gráfica.



**Figura 50.** Análisis de componentes principales (PCA) de los niveles de intensidad de picos espectrales  $^1\text{H}1\text{D}$  NMR en muestras de fotoperiodo simulado control (CS) y las muestras del fotoperiodo de luz continua (CL) en el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*.



Además, se obtuvo un análisis ( $\log_2FC$ ) de cambio en los niveles de intensidad de los 54 grupos de picos espectrales. Este análisis identificó once grupos (0.85, 0.97, 1.38, 1.91, 2.6, 2.63005, 3.17, 3.39, 3.81, 6.06 y 6.08) entre los tratamientos. Posteriormente se aplicó un análisis de FDR (false discovery rate) que identificó los valores correspondientes a 6 grupos (1.38, 3.33, 3.39, 3.82, 6.06 y 6.08). Con la aplicación de estos métodos estadísticos se obtuvieron 4 picos espectrales que cumplen las condiciones para ser considerados como diferencialmente presentes (Tabla 23). El pico 1.38 ppm presenta un valor  $\log_2FC$  negativo, esto indica una baja presencia en el tratamiento de luz continua, mientras que los valores de 3.39, 6.06 y 6.08 indican una alta presencia en el tratamiento de CL.

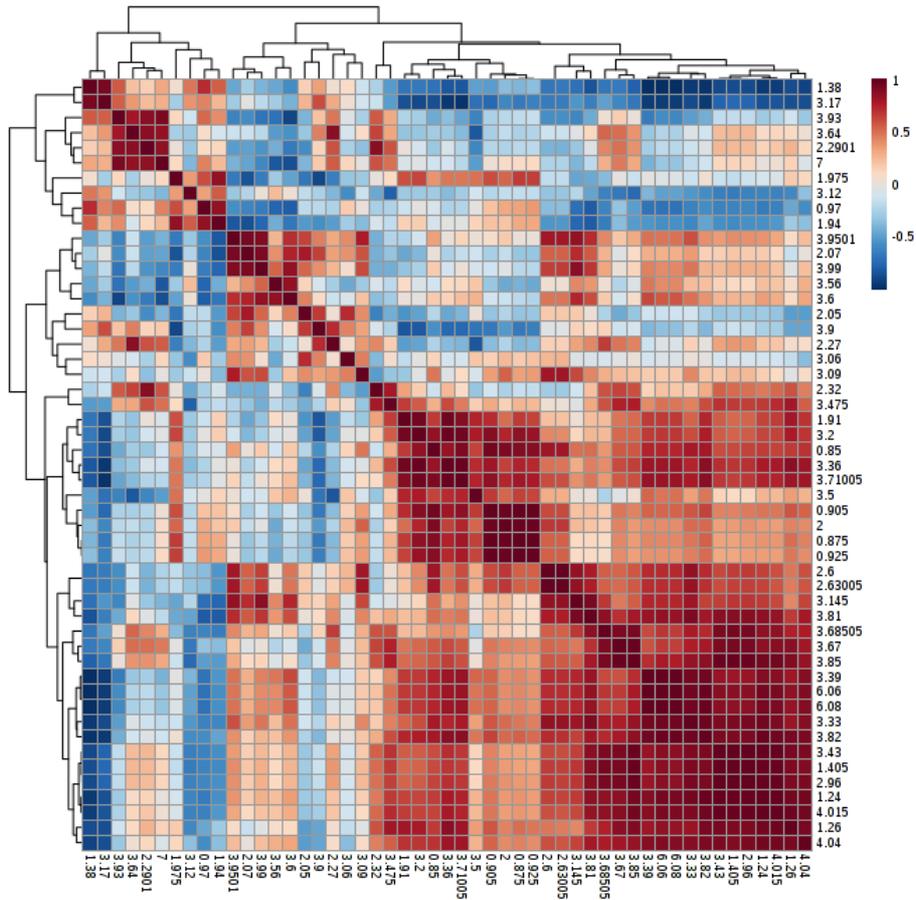
**Tabla 23.** Valores de presencia diferencial cuantitativa de los picos espectrales  $^1H$ -1D NMR en el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*.

No	ppm	$\log_2FC$	FDR	P-Value
1	1.38	-2.6738	7.58E-04	2.97E-05
2	3.39	4.4509	7.60E-04	4.47E-05
3	6.06	4.1585	8.98E-04	7.04E-05
4	6.08	4.2239	2.44E-04	4.79E-06

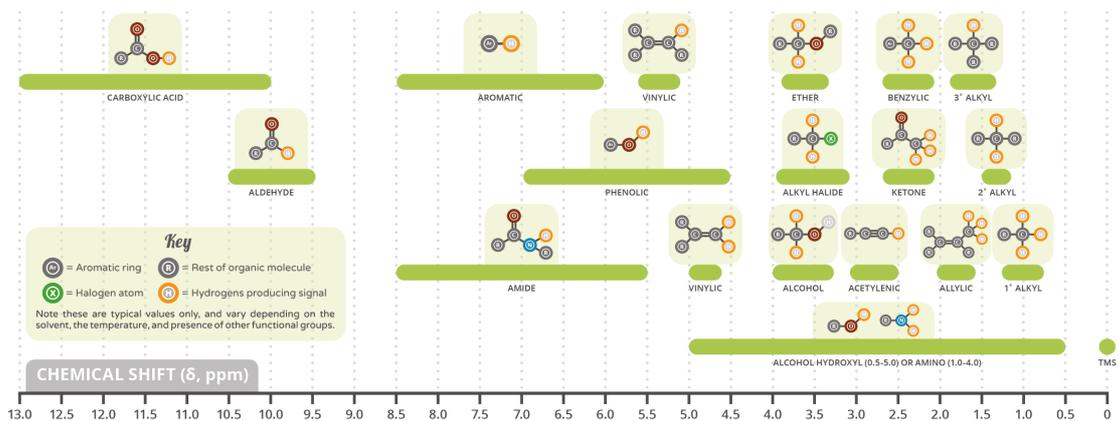
ppm (Identificador partes por millón del pico espectral);  $\log_2FC$  (Cambio del nivel de expresión en logaritmo en base 2); FDR (False discovery rate); P-Value (Valor probabilístico de error)

Por otro lado, se realizó un análisis de correlación de las intensidades por cada uno de los 54 grupos de picos espectrales analizados. En la Figura 51, se puede observar que alrededor del 50% de los grupos presentan altos niveles de correlación. Para el caso específico del pico espectral de 1.38 ppm se observa una alta correlación con los grupos de 0.97, 1.94, 3.12, 3.17 y 3.93 ppm, esto sugiere que podría existir un vínculo entre estos picos espectrales, que pueden servir de base para la identificación del metabolito involucrado. Para los picos espectrales 3.39, 6.06 y 6.08 ppm se observan bajos niveles de correlación con 14 picos espectrales (3.06, 2.27, 3.9, 2.05, 1.94, 0.97, 3.12, 1.975, 7, 2.2901, 3.64, 3.93, 3.17 y 1.38) lo que sugiere una posible interacción con el resto de los picos espectrales graficados (Figura 51). Sin embargo estas sugerencias deben profundizarse con futuros trabajos de identificación de metabolitos específicos.

Según la tabla espectral referenciada a Tetrametilsilano (Figura 52), el pico espectral de 1.38 ppm podría tratarse de un metabolito con presencia de los grupos funcionales 2' Alquilo (Etilo), alcohol, hidroxilo o grupo amino. Para el caso del pico de 3.39 ppm podría tratarse de un metabolito que contiene alguno de los grupos funcionales éter, haluro de alquilo, alcohol, hidroxilo o grupo amino. Con respecto a los picos de 6.06 y 6.08 ppm podría tratarse de metabolitos con grupos funcionales amidas, fenólicos o aromáticos; estos resultados indican que se debe realizar una caracterización más profunda con otras técnicas de identificación de metabolitos como espectrometría de masas, que además permitan realizar cuantificaciones precisas de la cantidad de metabolitos presentes en las muestras.



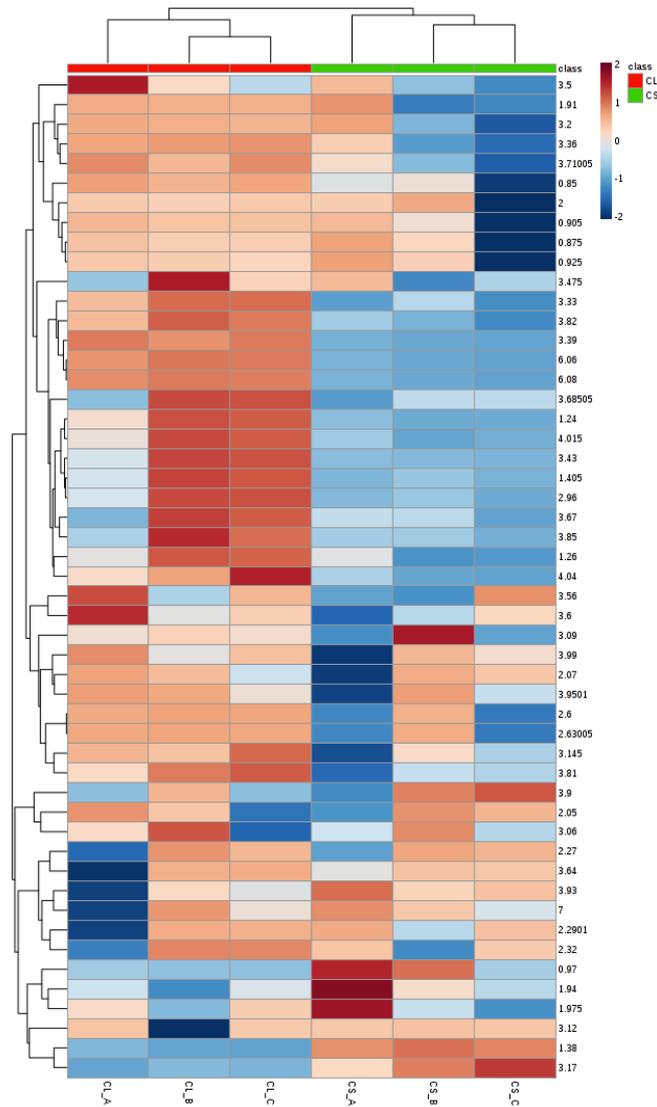
**Figura 51.** Análisis de correlación de los picos espectrales  $^1\text{H}1\text{D}$  NMR en las muestras de fotoperiodo simulado control (CS) y las muestras del fotoperiodo de luz continua (CL) en el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*.



**Figura 52.** Cambios químicos espectrales (ppm) para experimentos  $^1\text{H}1\text{D}$  NMR referenciados a TMS (Tetrametilsilano). <http://www.compoundchem.com/wp-content/uploads/2015/02/Analytical-Chemistry-1-H-NMR-Chemical-Shifts.png>



Por otro lado, para conocer el comportamiento de los niveles de intensidad de los picos espectrales por cada muestra se realizó una gráfica tipo heatmap (Figura 53). En la parte superior de la gráfica se observa el dendrograma de agrupamiento de las muestras, que indica dos grupos diferenciados de acuerdo a las intensidades de los picos espectrales y que corresponden a cada condición experimental (CS y CL).



**Figura 53.** Gráfica de los niveles de intensidad de los picos espectrales  $^1\text{H}$ -1D NMR en las muestras de fotoperiodo simulado control (CS) y las muestras del fotoperiodo de luz continua (CL) en el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*.

El dendrograma de la porción izquierda de la Figura 53 indica el agrupamiento de los picos espectrales de acuerdo sus niveles de intensidad. En el caso del pico espectral 1.38 ppm (baja presencia en CL) se observa un agrupamiento directo con los picos 3.17 y 3.12. Así como un agrupamiento secundario con 0.97, 1.94 y 1.975 ppm, esto indica que los picos de 0.97, 1.94, 3.17 y 3.12 ppm no solo tienen una alta correlación con el pico de 1.38 ppm (Figura 51); si



no que también existe un patrón común en los niveles de intensidad entre las muestras, lo que sugiere una relación estrecha entre estos picos (Figura 53). Los picos espectrales de 3.39, 6.06 y 6.08 ppm (alta presencia en CL) se agrupan directamente y presentan un agrupamiento secundario con los picos de 3.33 y 3.82. En conjunto estos resultados indican una interacción de los picos espectrales diferencialmente presentes con otros picos del espectro en cada muestra, por lo que estas observaciones pueden servir de base para la identificación futura de estos metabolitos con presencia diferencial entre los tratamientos de CS.

Adicionalmente al análisis <sup>1</sup>H1D, se realizó un análisis cualitativo COSY (<sup>1</sup>H-2D) en 2 dimensiones con el método cosygpqf2D (COrrrelation SpectroscopY). Este método identifica correlaciones entre los protones de las muestras. Cabe mencionar que este análisis COSY (<sup>1</sup>H-2D) fue de tipo exploratorio por lo que solo se analizó una muestra de cada condición experimental (Figura 54). Con este análisis cualitativo se distinguieron diferencias en el número de picos espectrales correlacionados. En la muestra del fotoperiodo control se reportan 849 picos mientras que para la muestra de CL se reportan 955 picos espectrales. En la Tabla 24 se reportan 72 picos que únicamente están presentes en la muestra de CS y 120 picos espectrales que solo se encuentran presentes en la muestra de CL.

**Tabla 24.** Picos espectrales COSY 1H-2D con presencia única en las muestras de fotoperiodo simulado control (CS) y las muestras del fotoperiodo de luz continua (CL) en el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*.

Picos espectrales COSY 1H-2D con presencia única en los tratamientos de fotoperiodo simulado control CS y luz continua CL																	
CS				CL				CS				CL					
No	f1 (ppm)	f2 (ppm)	f1 (ppm)	f2 (ppm)	No	f1 (ppm)	f2 (ppm)	f1 (ppm)	f2 (ppm)	No	f1 (ppm)	f2 (ppm)	f1 (ppm)	f2 (ppm)	No	f1 (ppm)	f2 (ppm)
1	0.06	0.06	0.53	1.22	31	2.75	2.74	2.12	2.13	61	6.97	7.73	4.17	4.32	91	6.45	2.89
2	0.56	0.57	0.56	0.56	32	2.8	3.16	2.3	2.07	62	7.19	7.19	4.25	4.5	92	6.71	6.72
3	0.67	0.67	0.7	0.7	33	2.86	2.93	2.32	2.56	63	7.26	7.27	4.27	4.19	93	6.73	6.74
4	0.83	1.93	0.75	1.18	34	3.16	4.55	2.35	2.22	64	7.41	7.42	4.28	2.39	94	6.75	6.75
5	0.89	0.9	0.78	0.87	35	3.34	2.3	2.36	2.62	65	7.51	7.51	4.32	5.27	95	6.76	6.76
6	0.97	0.98	0.81	0.82	36	3.98	3.82	2.45	2.37	66	7.52	7.52	4.38	4.44	96	6.78	6.78
7	0.99	1.06	0.82	0.83	37	4.05	4.05	2.49	2.49	67	7.69	7.74	4.39	4.46	97	6.96	7.05
8	1.02	1.12	0.91	1.89	38	4.34	2.91	2.51	2.6	68	7.77	5.79	4.43	4.92	98	7.03	7.03
9	1.03	1.04	1.13	1.13	39	4.36	4.37	2.54	2.45	69	7.89	7.89	4.59	4.84	99	7.04	7.04
10	1.07	1.21	1.16	0.74	40	4.37	4.67	2.66	2.56	70	7.93	7.94	4.63	5.78	100	7.05	7.05
11	1.11	1.12	1.24	1.63	41	4.43	4.72	2.71	3.78	71	8.41	8.41	4.66	6	101	7.13	7.13
12	1.17	0.76	1.25	1.36	42	4.46	4.45	2.74	2.63	72	8.6	8.61	4.78	4.7	102	7.19	7.2
13	1.22	4.15	1.28	1.12	43	4.53	4.49	2.75	2.75	73			4.84	4.83	103	7.23	7.34
14	1.42	1.43	1.31	0.88	44	4.73	4.63	2.79	2.56	74			4.9	4.86	104	7.27	7.27
15	1.43	1.44	1.39	0.87	45	4.95	4.95	2.81	3.32	75			4.92	5.07	105	7.29	7.29
16	1.47	1.47	1.4	1.92	46	4.96	4.71	2.85	2.95	76			4.94	4.93	106	7.37	7.37
17	1.55	1.56	1.41	1.41	47	4.98	4.67	2.93	3.26	77			4.97	4.97	107	7.42	7.42
18	1.8	2.21	1.42	1.42	48	4.99	4.67	2.99	3.18	78			5.01	4.91	108	7.53	7.53
19	1.87	0.91	1.59	1.59	49	5	4.67	3.24	4.74	79			5.02	4.51	109	7.62	7.62
20	1.93	1.97	1.63	1.64	50	5.05	4.67	3.25	1.24	80			5.21	5.21	110	7.77	5.8
21	2.05	2.53	1.66	1.25	51	5.17	5.17	3.26	3.72	81			5.23	5.23	111	7.83	6.01
22	2.16	2.07	1.69	0.94	52	5.18	5.18	3.37	3.13	82			5.25	5.25	112	7.89	7.9
23	2.19	1.76	1.71	1.72	53	5.19	5.19	3.65	1.84	83			5.43	5.43	113	7.98	7.98
24	2.35	2.46	1.72	1.68	54	5.29	3.49	3.68	3.34	84			5.84	5.85	114	7.99	7.94
25	2.38	2.39	1.78	1.88	55	5.5	5.51	3.71	3.38	85			5.86	5.86	115	8.14	7.49
26	2.39	4.28	1.85	1.95	56	5.53	5.53	3.72	3.77	86			5.89	5.89	116	8.16	1.19
27	2.4	2.55	1.86	1.96	57	5.99	5.99	3.84	3.69	87			6.12	6.13	117	8.32	8.33
28	2.59	4.28	1.98	1.98	58	6.14	3.21	3.89	2.77	88			6.17	6.18	118	8.33	8.33
29	2.64	2.64	2.02	1.91	59	6.78	6.79	3.94	3.83	89			6.2	6.21	119	10.43	4.02
30	2.65	3.3	2.04	2.04	60	6.79	7.09	4.09	4.25	90			6.23	3.12	120	10.45	3.99

f1ppm (Identificador partes por millón del pico espectral en la dimensión 1); f2ppm (Identificador partes por millón del pico espectral en la dimensión 2).

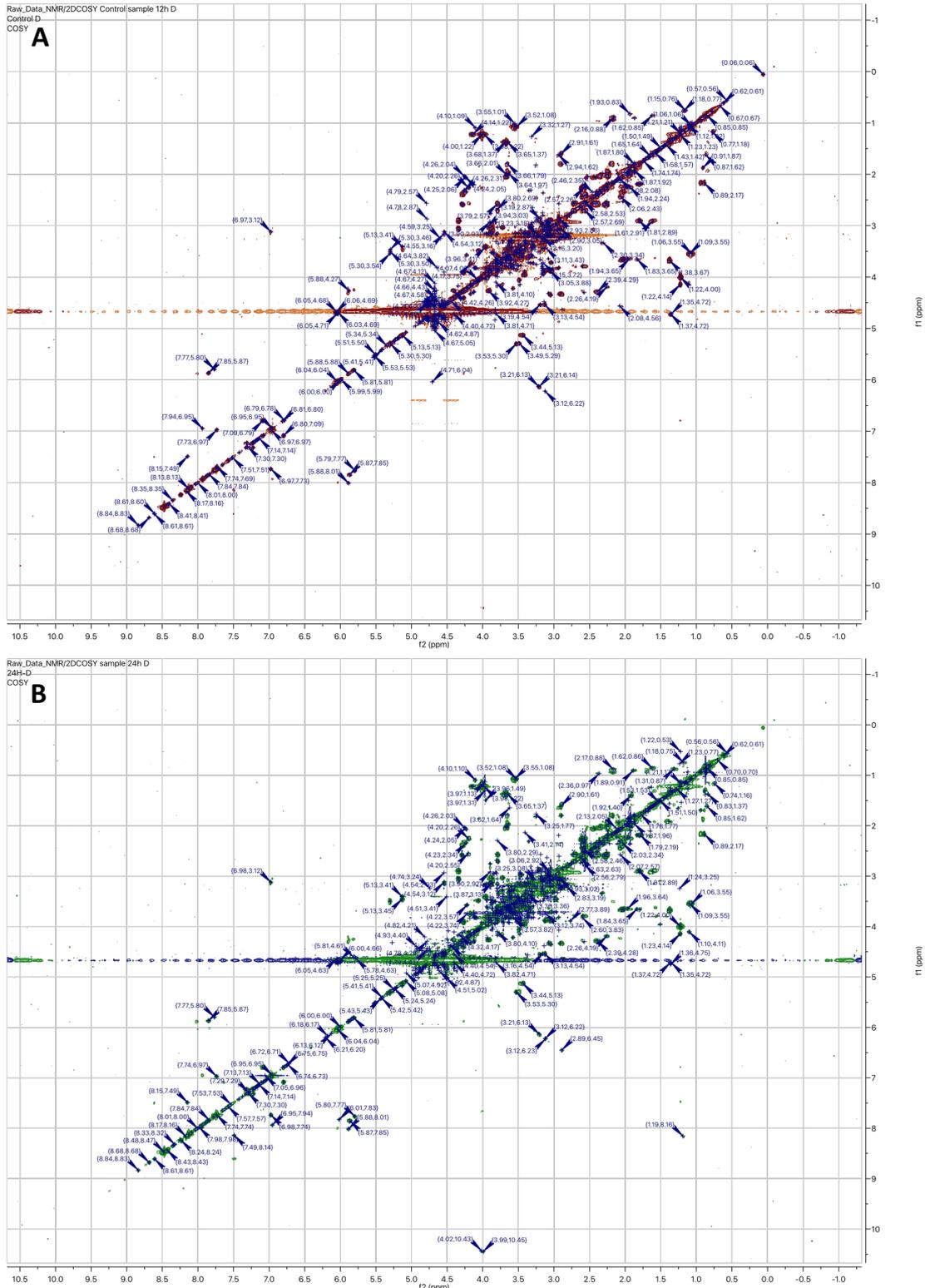


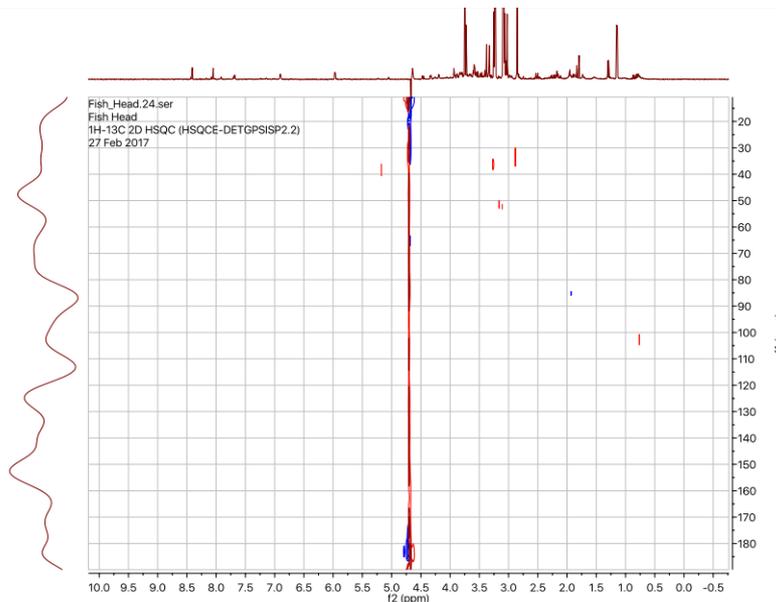
Figura 54. Comparación cualitativa de espectros COSY ( $^1\text{H}$ -2D) NMR en el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*. A) Muestra del fotoperiodo simulado control (CS); B) Muestra del fotoperiodo de luz continua (CL).



En la Figura 54 se observan los picos espectrales para las muestras analizadas en cada tratamiento. En estas gráficas puede visualizarse los picos únicos descritos en la Tabla 24. En conjunto los resultados del análisis exploratorio COSY ( $^1\text{H}$ -2D) sugieren que existen diferencias cualitativas entre los espectros de las muestras de CS y CL. Sin embargo se requiere de estudios posteriores con un mayor número de muestras para demostrar cuales son los metabolitos involucrados, así como los cambios en los niveles de presencia/ausencia de los mismos.

Con las muestras utilizadas para el análisis COSY ( $^1\text{H}$ -2D) también se realizó un análisis de espectroscopia correlacionada cuántica simple heteronuclear HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) de protones y carbonos ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) con el método (hsqcedetgpsisp2.2). Los espectros obtenidos de este análisis no cumplieron con la resolución esperada, ya que para obtener una buena resolución en los carbonos presentes en las muestras se requiere de un ambiente criogénico al momento de realizar el análisis de NMR. El laboratorio donde se realizaron los análisis de NMR no contaba con este aditamento del espectroscopio por lo que no fue posible mejorar el espectro HSQC.

En la Figura 55, se observa el espectro obtenido del análisis HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) NMR. Es evidente que el espectro de carbonos (porción izquierda de la figura) no tiene la resolución adecuada para poder identificar picos espectrales en la matriz de la gráfica. Para futuros trabajos realizar el experimento de HSQC es importante, ya que aporta información precisa para la identificación de los metabolitos de una manera más sencilla que con los otros métodos desarrollados.



**Figura 55.** Espectro HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) NMR en las muestras del pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*.



Por último con ayuda del programa Chenomx NMR suite 8.3, se lograron identificar 338 metabolitos presentes en las muestras (n=6) para CS y para CL, con metabolitos relacionados al metabolismo central, de aminoácidos, carbohidratos, proteínas, lípidos, etc. Los resultados obtenidos no se muestran en este apéndice debido a que no se cuenta actualmente con una licencia para exportar los resultados del programa Chenomx, sin embargo serán presentados en la publicación del artículo correspondiente.

### A3. Bibliografía

- Ching YL, Huifeng W, Ronald ST, and Mark RV (2007) Evaluation of metabolite extraction strategies from tissue samples using NMR metabolomics. *Metab.* 3,1,55. doi: 10.1007/s11306-006-0043-1
- Ganten D and Ruckpaul K (2006) *Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. XLII, 2090, ISBN 978-3-540-29623-2
- Harris RK, Becker ED, Cabral de Menezes SM, Goodfellow R, Granger P (2001) "NMR nomenclature. Nuclear spin properties and conventions for chemical shifts (IUPAC Recommendations 2001)". *Pure Appl Chem.* 73: 1795–1818. doi:10.1351/pac200173111795
- Hoffman, R. E. (2006) Standardization of chemical shifts of TMS and solvent signals in NMR solvents. *Magn Reson Chem.* 44: 606–616. doi:10.1002/mrc.1801
- Hollas JM (2005) *Modern Spectroscopy*, 4th Edition, Edward W. Castner Jr. *J Chem Edu* 82 (1), 43. doi: 10.1021/ed082p43.1
- Hopf FA, Shea RF, Scully MO (2010) Theory of Optical Free-Induction Decay and Two-Photon Superradiance. *Phys Rev A.* 7 (6): 2105–2110. doi:10.1103/PhysRevA.7.2105
- Kaltschnee L, Knoll K, Schmidts V, Adams RW, Nilsson M, Morris GA, Thiele CM (2016) Extraction of distance restraints from pure shift NOE experiments. *J Magn Reson.* 271:99-109. doi: 10.1016/j.jmr.2016.08.007
- Roberts GCK (2013) *Encyclopedia of Biophysics*. European Biophysical Societies Association (EBSA), pp 1163-1168. doi:10.1007/978-3-642-16712-6
- Schock TB, Duke J, Goodson A, Weldon D, Brunson J, et al. (2013) Evaluation of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Health during a Superintensive Aquaculture Growout Using NMR-Based Metabolomics. *PLOS ONE* 8(11): 10.1371/annotation/71a874d8-881f-4716-83ce-7af9fffb5462
- Wu H, Southam AD, Hines A, Viant MR (2008) High-throughput tissue extraction protocol for NMR- and MS-based metabolomics. *Anal Biochem.* 372: 204–212. doi: 10.1016/j.ab.2007.10.002

## APÉNDICE B. SECUENCIACIÓN GENÓMICA DE NOVO DEL PEZ BLANCO DE PÁTZCUARO *Chirostoma estor*

### B1. Metodología de extracción de ADN y secuenciación masiva (DNA-seq)

Aunado a los estudios transcriptómicos y metabolómicos, también se realizó la secuenciación del genoma de *C. estor* con un sistema de secuenciación masiva (DNA-seq) en el Laboratorio Nacional de Síntesis Ecológica (LANASE), de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) campus Morelia.

Como primer paso se obtuvo un pez adulto macho de *C. estor* de las instalaciones del Laboratorio Nacional de Nutrigenómica y Microbiómica Digestiva Animal (LANMDA). Este organismo se colocó en agua helada y posteriormente fue sacrificado para obtener una sección profunda del músculo en condiciones de esterilidad, con el fin de evitar contaminación por bacterias de la piel o del medio circundante.

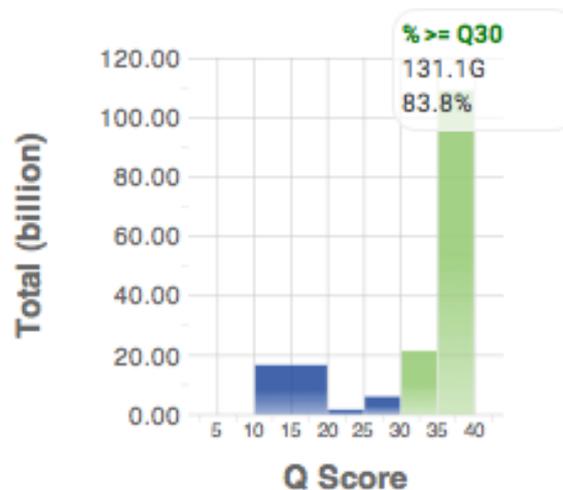


Con el tejido muscular de *C. estor* se realizó una extracción de DNA genómico (DNAg) con el método CTAB y un tratamiento de RNasa (Mirimin *et al.*, 2015). Una vez que se observó la integridad del DNAg por una electroforesis con un gel de agarosa al 1.5%, se realizó la limpieza y separación de fragmentos de DNA con el uso de las perlas AMPure XP según instrucciones del fabricante ([www.beckman.com](http://www.beckman.com)).

Una vez obtenidos los fragmentos con el tamaño requerido por el Nextera DNA Library preparation kit, se procedió a construir las librerías de secuenciación según instrucciones del fabricante ([www.illumina.com](http://www.illumina.com)). Se realizó una corrida de amplificación y secuenciación con una High-output Flow Cell en el Next seq 550 de illumina que permite obtener hasta 800 millones de lecturas pareadas (2 x 150 bp) con una salida de 100-120 Gigabases y con una calidad phred mayor a Q30 en al menos el 75% de las lecturas del DNAg.

## B2. Resultados de secuenciación genómica masiva (DNA-seq)

Con la corrida de secuenciación del genoma de *C. estor* en 150 ciclos, se obtuvo en promedio 131.1 Gigabases con una calidad mayor a Q30 en el 83.8% de las lecturas del DNAg (Figura 56). Estos valores indican que los resultados fueron mayores a las expectativas de los parámetros marcados por el equipo de illumina. Cabe mencionar que el genoma del pez blanco *C. estor*, se calcula en alrededor de 800 megabases de acuerdo al tamaño del genoma de otras especies similares. Esto quiere decir que se podría tener una profundidad de secuenciación de 163.87X, esto implica que el genoma está representado alrededor de 163 veces, con lo que se puede realizar un ensamblaje del genoma completo de alta calidad.



**Figura 56.** Distribución de la calidad de las lecturas obtenidas de la secuenciación del DNAg en el pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*.

Otras características del ensamblaje se presentan en la Tabla 25. En esta tabla pueden observarse los valores de las 4 líneas utilizadas en la secuenciación, el



número de lecturas, el porcentaje de agrupamiento, la calidad de lecturas, valores de intensidad, análisis de control de calidad, porcentajes de alineamiento con el genoma PhiX (genoma de referencia) y errores de la corrida de secuenciación.

**Tabla 25.** Resumen de la corrida de secuenciación para el DNAg del pez blanco de Pátzcuaro *C. estor*.

LANE	READ	TILES	DENSITY (K/ MM <sup>2</sup> )	CLUSTER PF (%)	PHAS/PREPHAS (%)	READS	READS PF	%Q30	YIELD	CYCLES ERR RATED	ALIGNED (%)	ERROR RATE (%)	ERROR RATE 35 CYCLES (%)	ERROR RATE 75 CYCLES (%)	ERROR RATE 100 CYCLES (%)	INTENSITY CYCLE 1	STATUS
1	1	216	219 ±8	91.13 ±0.95	0.143 / 0.145	142,283,552	129,624,416	85.32	19.44 Gbp	150	0.63 ±0.05	0.56 ±0.10	0.16 ±0.02	0.23 ±0.04	0.30 ±0.06	9,118 ±705	QC Passed
	2	216	219 ±8	91.13 ±0.95	0.190 / 0.182	142,283,552	129,624,416	82.57	19.42 Gbp	150	0.62 ±0.05	1.01 ±0.19	0.26 ±0.03	0.44 ±0.07	0.58 ±0.10	9,502 ±857	
2	1	216	219 ±6	91.18 ±0.73	0.138 / 0.149	141,773,040	129,244,784	85.58	19.38 Gbp	150	0.65 ±0.05	0.55 ±0.09	0.16 ±0.02	0.22 ±0.04	0.29 ±0.05	8,961 ±674	QC Passed
	2	216	219 ±6	91.18 ±0.73	0.188 / 0.192	141,773,040	129,244,784	82.38	19.36 Gbp	150	0.63 ±0.05	0.91 ±0.15	0.23 ±0.02	0.40 ±0.05	0.52 ±0.08	9,100 ±948	
3	1	216	219 ±5	91.30 ±0.79	0.140 / 0.143	141,901,232	129,535,480	85.63	19.42 Gbp	150	0.63 ±0.05	0.56 ±0.09	0.16 ±0.02	0.23 ±0.04	0.30 ±0.05	8,960 ±705	QC Passed
	2	216	219 ±5	91.30 ±0.79	0.191 / 0.185	141,901,232	129,535,480	82.61	19.39 Gbp	150	0.62 ±0.05	1.01 ±0.15	0.27 ±0.03	0.45 ±0.06	0.58 ±0.08	9,485 ±440	
4	1	216	219 ±8	91.36 ±0.96	0.136 / 0.146	142,279,936	129,978,912	85.76	19.49 Gbp	150	0.65 ±0.08	0.54 ±0.08	0.16 ±0.02	0.22 ±0.04	0.29 ±0.05	9,137 ±1,202	QC Passed
	2	216	219 ±8	91.36 ±0.96	0.177 / 0.180	142,279,936	129,978,912	82.92	19.45 Gbp	150	0.64 ±0.08	0.87 ±0.15	0.23 ±0.03	0.38 ±0.06	0.50 ±0.08	9,905 ±1,680	

Con las lecturas obtenidas de la corrida de secuenciación se realizará el ensamble genómico correspondiente con ayuda de los programas bioinformáticos diseñados para ensamblar *De Novo*. Con la colaboración del grupo de bioinformática de la Escuela Nacional de Estudios Superiores campus León (ENES-UNAM).

La información obtenida del transcriptoma, metaboloma y genoma de *C. estor*, sin duda servirá para desarrollar futuras herramientas biotecnológicas que permitan potenciar el cultivo de esta importante especie. Este esfuerzo es el primer análisis bajo el enfoque de biología de sistemas aplicado a un atherinopsido mexicano. Por lo que se considera que es una fuente de información de primera línea que aportará conocimientos innovadores a la comunidad científica nacional e internacional.

### B3. Bibliografía

Mirimin, L. and Roodt-Wilding, R. (2015), Testing and validating a modified CTAB DNA extraction method to enable molecular parentage analysis of fertilized eggs and larvae of an emerging South African aquaculture species, the dusky kob *Argyrosomus japonicus*. *J Fish Biol*, 86: 1218–1223. doi:10.1111/jfb.12639