



# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

## **DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA**

“Ritmos Biológicos y Relojes Moleculares  
en Teleósteos: Ontogenia y Sincronización  
a los Ciclos Diarios de Luz y Alimentación”

D. Jose Antonio Sánchez Férez  
2016





D. JORGE DE COSTA RUIZ, Profesor Titular de Universidad del Área de FISIOLÓGÍA y Director del Departamento de FISIOLÓGÍA, INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada “Ritmos biológicos y relojes moleculares en teleósteos: ontogenia y sincronización a los ciclos diarios de luz y alimentación“, ha sido realizada por D. JOSE ANTONIO SÁNCHEZ FÉREZ, bajo la inmediata dirección y supervisión de D. FRANCISCO JAVIER SÁNCHEZ VÁZQUEZ Y D. JUAN ANTONIO MADRID PEREZ, y que el Departamento ha dado su conformidad para que sea presentada ante la Comisión de Doctorado.

Murcia, a 2 de Mayo de 2010





D. FRANCISCO JAVIER SÁNCHEZ VÁZQUEZ, Profesor Titular de Universidad del Área de FISIOLÓGÍA en el Departamento de FISIOLÓGÍA, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Ritmos biológicos y relojes moleculares en teleósteos: ontogenia y sincronización a los ciclos diarios de luz y alimentación", realizada por D. JOSE ANTONIO SÁNCHEZ FÉREZ, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 2 de Mayo de 2010





D. JUAN ANTONIO MADRID PÉREZ, Catedrático de Universidad del Área de FISIOLOGÍA en el Departamento de FISIOLOGÍA, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Ritmos biológicos y relojes moleculares en teleósteos: ontogenia y sincronización a los ciclos diarios de luz y alimentación”, realizada por D. JOSE ANTONIO SÁNCHEZ FÉREZ, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 2 de Mayo de 2010





università di ferrara

Department of Biology and Evolution  
Via L. Borsari 46 – I-44100 Ferrara

**Cristiano Bertolucci**  
Assistant Professor

Tel. +39-0532-455485 Fax.+39-0532-207143  
@-mail: bru@unife.it

---

### Evaluation of PhD Thesis

The thesis “Ritmos biológicos y relojes moleculares en teleósteos: ontogenia y sincronización a los ciclos diarios de luz y alimentación” submitted by Jose Antonio Sánchez Férez to get the PhD. degree in Biology of the Universidad de Murcia (Spain) reports a very interesting set of experiments that appear to have been carried out to a high standard and interpreted appropriately.

The aim of the study was to investigate the molecular circadian clock in teleosts and to verify its entrainment to light-dark and feeding cycles using as models four different species: the Zebrafish *Danio rerio*, the European sea bass *Dicentrarchus labrax*, Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and the sea bream *Sparus auratus*.

To approach the aim, as first step, Sánchez Férez cloned *Per1*, a cardinal clock component in fish, in the European sea bass and verifies its daily expression in central and peripheral oscillators. Subsequently, using as molecular tool *Per1* mRNA expression, he investigated the ontogeny of circadian clock in sea bass and rainbow trout larvae exposed to different lighting conditions. Interestingly, he showed that some lighting conditions such as constant light, constant darkness or exposition to red light delayed the emergence of *Per1* rhythmic expression.

In the second part of the research, using as animal model the zebrafish, Sánchez Férez investigated the feeding entrainment of the daily rhythmicity both at behavioural (locomotor activity rhythm) and at molecular (*Per1* and *Cry1* mRNA expression) level. Intriguingly, he showed that daily feeding at a fix time influenced zebrafish locomotor activity but not clock gene expression in the brain. These results obtained in zebrafish provided a great scientific basis to study the influence of random and scheduled daytime feeding to the locomotor activity and the levels of blood parameters as cortisol, lactate and glucose in the sea bream.





università di ferrara

**Department of Biology and Evolution**  
Via L. Borsari 46 – I-44100 Ferrara

**Cristiano Bertolucci**  
Assistant Professor

Tel. +39-0532-455485 Fax.+39-0532-207143  
@-mail: bru@unife.it

---

The introduction is complete and clearly reports the state-of-the-art of the cronobiological research in fish. In the chapter III the candidate mainly illustrated the methodologies applied and the results obtained. The materials and methods used are appropriated. He well applied both behavioural and molecular assays. Furthermore the statistical data analysis is appropriate. Each results showed has been well discussed. The chapters IV and V clearly report general discussion and conclusions.

To whom it my concerns I declare that the work submitted as PhD thesis by Jose Antonio Sánchez Férez has achieved the declared research goals. It has shown a great ability of the candidate to approach a research in the field of chronobiology choosing suitable methods and tools. The work carried out new valuable scientific results.

Should you need any further information, please do not hesitate to contact me.

Yours sincerely,

Dr. Cristiano Bertolucci, PhD







università di ferrara

**Department of Biology and Evolution**

Via L. Borsari 46 – I-44100 Ferrara

**Cristiano Bertolucci**  
Assistant Professor

Tel. +39-0532-455485 Fax.+39-0532-207143  
@-mail: bru@unife.it

---

### **Evaluation of PhD Thesis**

La tesis “Ritmos biológicos y relojes moleculares en teleósteos: ontogenia y sincronización a los ciclos diarios de luz y alimentación” presentada por Jose Antonio Sánchez Férez para optar al grado de Doctor por la Universidad de Murcia (España) recoge un conjunto de interesantes experimentos de alto nivel y que han sido interpretados correctamente.

El objetivo de este estudio fue investigar los relojes moleculares en teleósteos y verificar su sincronización a los ciclos diarios de luz-oscuridad y a los ciclos de alimentación usando como modelo cuatro especies diferentes: El pez cebra *Danio rerio*, lubina Europea *Dicentrarchus labrax*, trucha arcoíris *Rainbow trout* y dorada *Sparus auratus*.

Como primer paso, Sánchez Férez clonó el gen *Per1*, un componente central de los relojes moleculares de peces, en lubina Europea y verificó su expresión diaria en osciladores centrales y periféricos. Posteriormente, usando como herramienta molecular la expresión del mRNA de *Per1*, el investigó la ontogenia de los relojes moleculares en larvas de lubina y trucha expuestas a diferentes condiciones lumínicas. Interesantemente, mostró que algunas condiciones lumínicas tales como la luz constante, la oscuridad constante o la exposición a luz roja retrasan la aparición de la expresión rítmica de *Per1*.

En la segunda parte de esta investigación, usando como modelo el pez cebra, Sánchez Férez investigó la sincronización al alimento de los ritmos diarios de comportamiento (ritmos de actividad locomotora) y de los ritmos de expresión de los mRNA de *Per1* y *Cry1*. Intrigantemente, el mostró que los ritmos diarios de alimentación influyeron sobre la actividad locomotora de peces cebra pero no afectaron a la expresión de genes reloj en cerebro. Estos resultados obtenidos en pez cebra proporcionan una gran base científica para estudiar la influencia de los ciclos de alimentación aleatoria y periódica sobre la actividad locomotora y los niveles plasmáticos de parámetros tales como el cortisol, lactato y glucosa en dorada.

La introducción es completa e informa claramente sobre el estado del conocimiento de la cronobiología en peces. En el capítulo III el candidato ilustra las metodologías aplicadas y los resultados obtenidos. Los materiales y métodos usados son apropiados. El





università di ferrara

**Department of Biology and Evolution**

Via L. Borsari 46 – I-44100 Ferrara

**Cristiano Bertolucci**  
Assistant Professor

Tel. +39-0532-455485 Fax.+39-0532-207143  
@-mail: bru@unife.it

candidato aplica bien tanto ensayos a nivel do comportamiento como ensayos moleculares. Además los análisis estadísticos son apropiados. Cada resultado mostrado ha sido bien discutido. Los capítulos IV y V presentan claramente la discusión general y las conclusiones.

Respecto a lo que a mí concierne, declaro que el trabajo realizado como Tesis doctoral por Jose Antonio Sánchez Férez ha logrado alcanzar los objetivos de investigación propuestos. El candidato muestra una gran habilidad para abordar estudios en el campo de la cronobiología, escogiendo métodos y herramientas apropiadas. Esta obra proporciona nuevos y valiosos resultados científicos.

Si usted necesita cualquier información adicional, por favor no dude en contactar conmigo.  
Suyo sinceramente,

Dr. Cristiano Bertolucci, PhD







**Evaluation Report of PhD Thesis**  
**“Ritmos biológicos y relojes moleculares en teleósteos: ontogenia y  
sincronización a los ciclos diarios de luz y alimentación”**

**D. José Antonio Sánchez Férez**

The theme of J.A. Sánchez Férez's thesis is of particular relevance, and its results are an important contribution to fish chronobiology, bringing about new insights of the mechanisms controlling the daily rhythms and their synchronization with the environmental factors. It is to enhance the molecular cloning of the gene *Per1* in European Seabass, which is a new tool, very useful to the study of the circadian system of this species at a molecular level.

This thesis is well written and is structured as a collection of four experimental chapters, preceded by a general introduction and ending with an integrated discussion. The general introduction makes an extensive and up to date review of the current knowledge concerning all the aspects that were considered in this work.

Three of the four experimental chapters correspond to papers published in international high standard journals included in the Science Citation Index, which reflect the high quality of the work developed. The papers focused on complementary aspects of the mechanisms of synchronization of the biological clock (and of the circadian rhythms) to the environmental factors and feeding schedule, as well as on the molecular cloning and ontogeny of clock genes. The methods and experimental design of each chapter were carefully selected and the results correctly interpreted. In the discussion sections of these papers the significance of the results obtained is also fully explored taken into account the existing literature on the subject. This work involved a considerable experimental work and the use of many analytical techniques and protocols. It is to enhance the use of molecular biology, which is a modern tool that allowed confirming the control of the circadian system at a molecular level. Also, the statistical analyses that were used were adequate according to data and goals of the several studies developed.

Finally, the General Discussion section gives a very good integrative perspective of the results and their significance obtained in all the experiments that were conducted. In this section, it can be noticed the major contribution that this work gave to its field of research.

In my opinion the doctoral thesis submitted by Mr. José Antonio Sánchez Férez meets the required European Standards for obtaining a PhD degree.

Olhão, 23rd March 2010

Catarina Oliveira







**Informe de evaluación de tesis doctoral**  
**"Ritmos biológicos y relojes moleculares en teleósteos: ontogenia y  
sincronización a los ciclos diarios de luz y alimentación"**

**D. José Antonio Sánchez Férez**

El tema de la tesis doctoral de D. J.A. Sánchez Férez es bastante relevante y sus resultados son una contribución importante para el conocimiento de la cronobiología en peces, una vez que nos traen nuevos datos sobre los mecanismos que controlan los ritmos diarios y su sincronización con los factores ambientales. Es de destacar la clonación del gen *Per1* de lubina, que es una nueva herramienta muy útil para el estudio a nivel molecular del sistema circadiano de esta especie.

Esta tesis está bien escrita y estructurada como un compendio de cuatro capítulos experimentales, precedido por una introducción general y concluyendo con una discusión integrada. La introducción hace una revisión extensa y actualizada del conocimiento actual con respecto a todos los aspectos considerados en este trabajo.

Tres de los cuatro capítulos experimentales corresponden a artículos publicados en revistas internacionales de alto nivel, incluidas en el "Science Citation Index", lo que demuestra la alta calidad del trabajo desarrollado. Los artículos enfocan aspectos complementarios de los mecanismos de sincronización del reloj biológico (y de los ritmos circadianos) a factores ambientales y a la hora del alimento, bien como la clonación y ontogenia de genes reloj. Los métodos y el diseño experimental de cada capítulo fueron seleccionados cuidadosamente, y los resultados correctamente interpretados. En las secciones de discusión de estos artículos la significancia de los resultados obtenidos es también íntegramente explorada, teniendo en cuenta la literatura existente en el tema. Esta memoria abarcó un trabajo experimental considerable, y el uso de muchas técnicas analíticas y protocolos. Es de resaltar el uso de la biología molecular, que es una herramienta muy actual y que permitió confirmar el control del sistema circadiano a nivel molecular. También los análisis estadísticos usados fueron adecuados, de acuerdo con los datos y los objetivos de los varios estudios desarrollados.

Finalmente, la sección de discusión general nos da una perspectiva integrante muy buena de los resultados obtenidos en todos los experimentos llevados a cabo, y su significancia. En esta sección, se puede notar la importante contribución que este trabajo aporta a su campo de investigación.

En mi opinión, la tesis doctoral sometida por D. José Antonio Sánchez Férez se encuentra dentro de los estándares europeos para la obtención del grado de doctor.

Olhão, 23 Marzo 2010

Catarina Oliveira





## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis es el resultado del trabajo y apoyo de muchas personas. Sin duda, esta tesis no hubiera sido posible sin ellas, y les estoy enormemente agradecido. Muchísimas gracias a todos, en especial a:

Francisco Javier Sánchez Vázquez y Juan Antonio Madrid, mis directores de tesis. A Juan Antonio, por haberme acogido en su grupo de investigación y por darme la oportunidad de iniciarme en el mundo de la investigación. A Javier, por toda la confianza que depositó en mí, tanto en el aspecto profesional, como en el personal, y también por su constante apoyo, dedicación y atención a lo largo de estos últimos años.

Todos los profesores del departamento de Fisiología, por sus buenos consejos y por estar siempre disponibles para ayudarme en todo lo que he necesitado durante esta etapa. Y a Jorge, por su inestimable ayuda en todos los trámites necesarios para la lectura de esta tesis.

Los miembros del departamento de Biología Celular, sobre todo a Víctor Mulero y a Pilar, por haberme permitido trabajar en su laboratorio. Y especialmente, a Azucena, por su apoyo y ayuda incondicionales.

Quiero dar un agradecimiento especial a mis compañeros de laboratorio, que me han acompañado durante estos últimos años: Catarina, Jose Fernando, Luisa, Borja, Ana, Natalia, Ander, Rodrigo, Terry, Mila, Jose Antonio y Moises. Y también a todos mis compañeros de departamento: Pedro, Pablo, Bea, Antonio, Tere y Eli... Junto a todos vosotros he vivido esta larga aventura y me llevo el recuerdo de muy buenos momentos, gracias a todos.

Al personal del servicio de cultivos celulares del SACE y del servicio de Biología Molecular del CAID (SACE), en especial a Cesar, Antonia, María José, Juana y Pepe, por estar constantemente disponibles y prestarme siempre su ayuda.

Mi estancia en Escocia, no hubiera sido posible sin Herve Migaud y Andrew David de la Universidad de Stirling y de nuevo, Luisa. Gracias a los tres, sobre todo por el esfuerzo para comprenderme, a pesar de las dificultades lingüísticas. Y por supuesto, no me olvido de todos los que me acompañaron durante mi estancia: Luisa, Susi, Armyn, Oscar, Juan... Sin vosotros esta pequeña etapa no hubiera sido lo mismo.

A toda mi familia y amigos, y en especial, a mis padres y hermanas, por su cariño y apoyo, durante todos los días de mi vida. A vosotros os debo lo debo todo.

Y por último, a María Dolores, no tengo palabras suficientes para agradecer tu constante apoyo, cariño y comprensión.

# ÍNDICE



# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
<b>1. Ritmos biológicos. Generalidades.....</b>	<b>7</b>
<b>2. El sistema circadiano.....</b>	<b>8</b>
<b>3. Sincronizadores o zeitgebers del sistema circadiano.....</b>	<b>11</b>
3.1 Sincronizadores abióticos: El fotoperiodo.....	12
3.2 Sincronizadores bióticos: El alimento.....	14
<b>4. Relojes moleculares.....</b>	<b>15</b>
4.1 Evolución genómica y relojes moleculares.....	18
4.2 Ontogenia de los relojes moleculares.....	18
<b>5. Biología de las especies estudiadas.....</b>	<b>22</b>
5.1 <i>Danio rerio</i> (Hamilton, 1822).....	22
5.2 <i>Sparus aurata</i> (Linnaeus, 1758).....	23
5.3 <i>Dicentrarchus labrax</i> (Linnaeus, 1758).....	24
5.4 <i>Oncorhynchus mykiss</i> (Walbaum, 1792).....	26
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
<b>III. CAPÍTULOS EXPERIMENTALES.....</b>	<b>31</b>
<b>III.I RELOJES MOLECULARES Y ONTOGENIA.....</b>	<b>33</b>
<b>1. Clonación del gen <i>per1</i> en lubina.....</b>	<b>35</b>
1. <i>Resumen</i>	
3. <i>Introducción.</i>	
3. <i>Material y métodos.</i>	
4. <i>Resultados</i>	
5. <i>Discusión.</i>	
6. <i>Agradecimientos</i>	
7. <i>Referencias bibliográficas.</i>	
<b>2. Ontogenia del reloj circadiano en larvas de lubina.....</b>	<b>61</b>
1. <i>Resumen.</i>	

2. <i>Introducción.</i>	
4. <i>Material y métodos.</i>	
5. <i>Resultados.</i>	
6. <i>Discusión</i>	
7. <i>Agradecimientos.</i>	
<b>3. Ontogenia de los relojes moleculares en trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) durante estadios tempranos del desarrollo.....</b>	<b>75</b>
1. <i>Resumen.</i>	
2. <i>Introducción.</i>	
4. <i>Material y métodos.</i>	
5. <i>Resultados y discusión.</i>	
8. <i>Agradecimientos.</i>	
<b>III.II. EL ALIMENTO COMO SINCRONIZADOR DE RELOJES MOLECULARES Y DE LOS RITMOS FISIOLÓGICOS Y DE COMPORTAMIENTO.....</b>	<b>85</b>
<b>4. Sincronización de los ritmos de actividad y expresión de genes reloj a los ciclos de alimentación en <i>zebrafish</i>.....</b>	<b>87</b>
1. <i>Resumen</i>	
2. <i>Introducción.</i>	
3. <i>Material y métodos.</i>	
4. <i>Resultados</i>	
5. <i>Discusión.</i>	
6. <i>Agradecimientos</i>	
7. <i>Referencias bibliográficas.</i>	
<b>5. Efecto de los ciclos de alimentación sobre los ritmos de actividad y la respuesta a estrés en la dorada (<i>Sparus aurata</i>).....</b>	<b>111</b>
1. <i>Resumen</i>	
2. <i>Introducción</i>	
3. <i>Material y métodos</i>	
4. <i>Resultados</i>	
5. <i>Discusión</i>	
6. <i>Agradecimientos</i>	
7. <i>Referencias bibliográficas.</i>	
<b>IV. DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>129</b>
<b>IV.I. Relojes moleculares.....</b>	<b>132</b>

---

<b>IV.II Sincronización a la luz y alimento.....</b>	<b>139</b>
<b>V. CONCLUSIONES. ....</b>	<b>143</b>
<b>VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>147</b>
<b>VII. GLOSARIO.....</b>	<b>161</b>
<b>VIII. ANEXOS.....</b>	<b>167</b>
<b>1. Producción científica.....</b>	<b>169</b>
<b>2. Becas y contratos de investigación.....</b>	<b>170</b>
<b>3. Estancias breves.....</b>	<b>171</b>
<b>4. Proyectos de investigación.....</b>	<b>171</b>
<b>IX. RESUMEN EN INGLÉS.....</b>	<b>173</b>



# **I. INTRODUCCIÓN.**



## 1. RITMOS BIOLÓGICOS. GENERALIDADES.

La ritmicidad es una ley universal. La mayor parte de los fenómenos que ocurren en el universo presentan cambios cíclicos, repitiéndose con periodo característico. Esta repetición de eventos o fenómenos en intervalos regulares de tiempo se denomina **ritmo**. La naturaleza rítmica del universo aparece desde niveles atómicos, como la oscilación de los átomos y las moléculas, hasta niveles geofísicos, como las orbitas que describen de los planetas.

Nuestro planeta también está sometido a cambios cíclicos periódicos debidos principalmente a los ciclos geofísicos de rotación y traslación del planeta. Estos ciclos son responsables de variaciones en las condiciones ambientales de la superficie terrestre que se ponen de manifiesto en los cambios estacionales, los ciclos diarios de luz/oscuridad, las mareas etc. A excepción de algunas especies que habitan en lugares cuyas condiciones son prácticamente constantes (i.e. cuevas, fondos oceánicos), la mayoría de especies han estado sometidas a estos persistentes ciclos ambientales a lo largo de la evolución. Bajo esta presión selectiva, surgieron mecanismos adaptativos que permitirían a los organismos “medir” el tiempo, adquiriendo así la ventaja de poder predecir y anticiparse a estos eventos recurrentes. Estos mecanismos se encuentran en la actualidad muy difundidos en la naturaleza, apareciendo desde en bacterias hasta humanos, incluyendo también a plantas y animales. Su gran difusión y su alto grado de conservación, al menos en los mecanismos básicos, nos indica su enorme importancia.

La ritmicidad impuesta por la naturaleza también ha hecho que los organismos presenten una organización temporal característica, de manera que gran parte de los procesos biológicos de los seres vivos se desarrollan de forma rítmica y predecible. Por ejemplo, los ritmos de actividad motora y los niveles hormonales plasmáticos de vertebrados (i.e. cortisol) siguen un patrón cíclico con periodo cercano a 24h. Estos fenómenos biológicos que ocurren en intervalos regulares de tiempo se denominan **ritmos biológicos** (Aschoff, 1981).

Las primeras observaciones sobre ritmos biológicos, de las que se tienen constancia, provienen de la antigua Grecia. En principio, los ritmos biológicos eran considerados simples respuestas a cambios ambientales y no fue hasta 1972, cuando el astrónomo francés Jean Jacques d’Ortous de Mairan en la “Histoire de l’Académie Royale des Sciences” sugirió el

carácter endógeno de los ritmos biológicos al observar que los ritmos diarios de apertura y cierre de las hojas de la planta *Mimosa pudica* persistían bajo condiciones constantes de oscuridad. Con este descubrimiento, junto con otros estudios posteriores, surgió la **cronobiología**, como la ciencia encargada de estudiar los ritmos biológicos, los mecanismos que los originan y sus alteraciones.

En cronobiología, los ritmos biológicos se clasifican en función de su periodo o *tau* ( $\tau$ ), es decir, en función del periodo de tiempo en el que se lleva a cabo un ciclo completo. De esta forma encontramos ritmos **ultradianos** (cuyo periodo es inferior a 20 h), ritmos **circadianos** (cuyo periodo está entre 20 y 28 horas) y ritmos **infradianos** (con un periodo superior a 28 h). Dentro de estos últimos existen ritmos circanuales con un periodo anual, normalmente ligados a cambios estacionales, y ritmos circalunares ligados generalmente a los ciclos lunares. Entre los ritmos ultradianos encontramos por ejemplo, la sincronización a las mareas que se ha observado en algunos bivalvos de la zona intermareal, los cuales regulan la apertura y cierre de sus valvas con un periodo de unas 12 horas (Beentjes y William, 1986; Palmer, 1995).

A pesar de la existencia de ritmos biológicos con diferentes periodos (diarios, anual, lunar etc.), los ritmos biológicos más estudiados y probablemente los más importantes son los ritmos circadianos (del latín *circa*, cercano; *diem*, día), los cuales son el objeto de estudio de esta tesis doctoral. Los ciclos diarios de luz/oscuridad generan importantes cambios ambientales, como por ejemplo variaciones en la temperatura y en la disponibilidad de alimento. Además, la enorme estabilidad de los cambios del fotoperiodo a lo largo del año para cada latitud ha permitido que los animales utilicen dicha señal de modo preferente para conocer el paso de las estaciones.

## **2. EL SISTEMA CIRCADIANO.**

La organización temporal de los organismos se pone de manifiesto en la mayoría de procesos fisiológicos y comportamentales que ocurren cíclicamente, incluso en situaciones de aislamiento. Algunos autores como Pittendrigh ó Aschoff, considerados como los padres de la cronobiología, propusieron la existencia de estructuras orgánicas de localización anatómica específica, con una ritmicidad propia y autónoma, que actuarían como **marcapasos u**

**osciladores circadianos**, regulando todos los parámetros rítmicos observables en los organismos. Estos últimos ritmos, que pueden ser medidos y observados (bioquímicos, fisiológicos y conductuales), son denominados **ritmos manifiestos**. Para otros autores, como Halberg ó Reinberg, el reloj biológico sería el resultado de múltiples procesos fisiológicos oscilatorios que ajustan sus fases (Aschoff, 1960; Pittendrigh, 1960; Halberg, 1960). Actualmente se impone la primera de las hipótesis, pues se ha demostrado la existencia de estructuras anatómicas que actúan como **osciladores circadianos** endógenos con una periodicidad próxima a 24 horas.

En peces, anfibios, reptiles y aves, el órgano pineal, que posee fotorreceptores directos, desempeña funciones de marcapasos circadiano. En mamíferos, el reloj o marcapasos circadiano principal se localiza en los núcleos supraquiasmáticos del hipotálamo (NSQ). La generación de oscilaciones de periodo circadiano en la actividad nerviosa y humoral de los NSQ parece ser el resultado de la actuación sincronizada de los relojes moleculares presentes en cada una de las neuronas que lo componen. Así pues, los NSQ son responsables de la mayoría de los ritmos circadianos presentes en mamíferos.

Para que los ritmos se mantengan sincronizados a los ciclos ambientales es necesario que el marcapasos circadiano se sincronice periódicamente a determinados factores ambientales denominados sincronizadores o zeitgeber. Esta sincronización es posible gracias a la existencia de vías de entrada de la información al oscilador circadiano y mecanismos transducción de las señales ambientales externas.

Además de los NSQ, la pineal y la retina, el sistema circadiano se compone de números osciladores secundarios (hígado, riñón, cortex cerebral etc.), capaces de producir oscilaciones circadianas. Estos osciladores pueden funcionar autónomamente en cultivos de tejidos, sin embargo, en condiciones normales se encuentran bajo el control del oscilador principal, al menos en el caso de mamíferos. La sincronización de estos osciladores secundarios tiene lugar a través de vías de salida del oscilador principal, principalmente señales nerviosas y señales humorales, entre las que destaca el ritmo circadiano de secreción de la hormona melatonina por el órgano pineal.

En resumen, el conjunto formado por los osciladores circadianos endógenos, vías de sincronización y mecanismos de difusión del mensaje rítmico se conoce como **sistema circadiano** (Fig. 1). Este sistema genera y controla toda una serie de ritmos manifiestos, como los ritmos de actividad, los ritmos en la secreción de numerosas hormonas y los ritmos de alimentación.

Por otro lado, aunque la organización anatómica y funcional del sistema circadiano difiere en los distintos grupos vertebrados, los mecanismos moleculares básicos responsables de la ritmicidad son similares tanto en vertebrados, como en invertebrados.

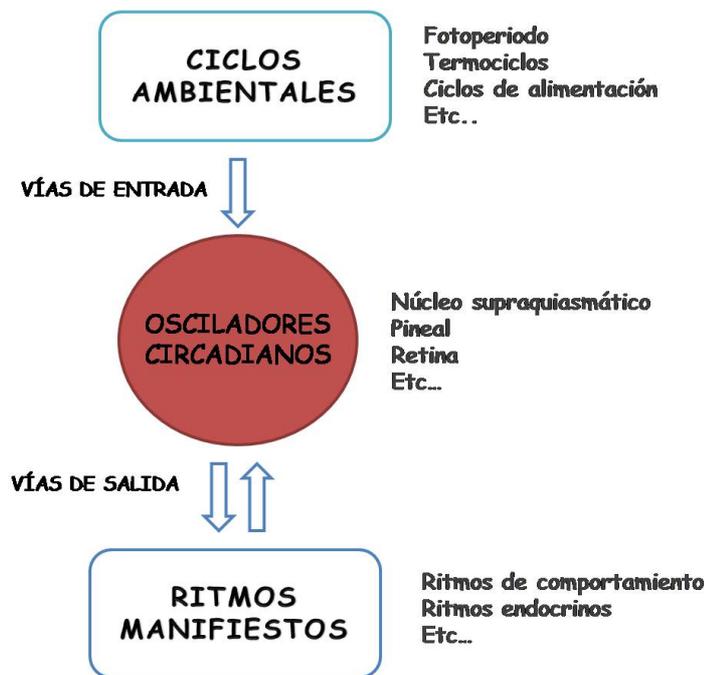


Figura 1. Esquema sobre la organización general del sistema circadiano. El modelo está basado en la existencia de osciladores endógenos que conducen los ritmos manifiestos de los organismos a través de una serie de vías de salida. Existen también vías de entrada, a través de las cuales, los osciladores reciben la información ambiental y se sincronizan al medio ambiente.

### 3. SINCRONIZADORES O ZEITGEBERS DEL SISTEMA CIRCADIANO.

En ausencia de sincronizadores el marcapasos circadiano se desajusta ligeramente y oscila con periodo endógeno o *tau* ( $\tau$ ) cercano, pero no igual, a 24 h. En esta situación los animales mantienen su ritmicidad, sin embargo, los ritmos manifiestos, como por ejemplo los ritmos de actividad, corresponden a un día y noche subjetivos que dependen del periodo endógeno del oscilador circadiano. Esta situación se denomina como “**curso libre**”.

Sin embargo, aunque los osciladores circadianos son capaces de generar ritmos en aislamiento, su verdadero valor adaptativo reside en su capacidad de sincronizarse a los ciclos ambientales. Generalmente, los ritmos fisiológicos y comportamentales se mantienen acoplados o encarrilados con los ciclos ambientales, permitiendo al organismo anticiparse y adaptarse a estos cambios ambientales periódicos.

En curso libre, el periodo de los relojes biológicos no suele ser de 24 horas exactas, sino que puede ser un poco mayor o menor según la especie o incluso en función del individuo. Esto hace que sea necesaria una resincronización diaria para mantener su fase acoplada a los ciclos ambientales. Los factores ambientales que son capaces de sincronizar los relojes biológicos reciben el nombre de **sincronizadores o zeitgeber** (del alemán *Zeit*, tiempo; *geber*, dador) y permiten que los ritmos bioquímicos, fisiológicos y comportamentales del organismo, controlados por los relojes biológicos, se mantengan en fase con los ciclos ambientales. De esta forma, el sistema circadiano se muestra plástico y modificable, lo que permite una rápida adaptación a variaciones en los ciclos ambientales.

El funcionamiento de los sincronizadores es el siguiente: Los estímulos ambientales, que actúan como sincronizadores, son captados por los transductores (como la retina), que transmiten la información hasta el reloj endógeno, el cual se sincroniza con estos estímulos modificando su fase y periodo. A su vez, este oscilador controla una multitud de ritmos fisiológicos y comportamentales del organismo. Este sistema se autorregula por una retroalimentación de las variables rítmicas sobre el propio oscilador, de manera que algunas de las salidas pueden actuar también a modo de entradas o sincronizadores (Rietveld, 1992).

Así pues, los sincronizadores actúan sobre los relojes biológicos modificando su fase y periodo. Sin embargo, los organismos también pueden responder pasiva y directamente a los

factores ambientales. En algunos casos, los animales modifican alguno de sus ritmos fisiológicos o comportamentales en respuesta a un cambio brusco en los ciclos ambientales, sin que se modifique la fase de su reloj endógeno (Madrid et al., 2001). En estos casos, los ciclos ambientales no están actuando como *zeitgeber* sino que tienen un efecto enmascarante de los ritmos biológicos endógenos. Este efecto se denomina *masking* o **enmascaramiento** y se puede poner de manifiesto cuando se eliminan los ciclos ambientales, de manera que los ritmos biológicos entran en curso libre revelando su verdadera fase y periodo. (Aschof, 1981).

Para que una variación ambiental sea considerada un sincronizador debe cumplir una serie de condiciones (Moore-Ede et al., 1982):

- En curso libre, el ritmo biológico debe tener un determinado periodo, antes de que el animal sea expuesto al sincronizador y volver a recuperar ese periodo cuando el sincronizador es eliminado.
- Una vez el animal es expuesto al sincronizador, el periodo del ritmo biológico debe coincidir con el periodo del sincronizador.
- Debe aparecer una relación de fase estable entre el ritmo y el sincronizador, tras unos días de exposición al *zeitgeber*.
- Cuando el sincronizador es eliminado, el ritmo biológico debe entrar en curso libre, partiendo de la fase del sincronizador.

El sincronizador más estudiado es la luz, sin embargo en los últimos años se ha demostrado la existencia de otros sincronizadores muy importantes, como son los ciclos de alimentación o de disponibilidad de alimento, los termociclos e incluso las interacciones sociales. Así pues, algunos autores clasifican a los sincronizadores en abióticos o bióticos, en función de si están relacionados con parámetros físico-químicos o biológicos.

### **3.1. SINCRONIZADORES ABIÓTICOS: EL FOTOPERIODO.**

La luz es considerada el sincronizador más potente del sistema circadiano. La mayoría de los ritmos biológicos de vertebrados, tanto ritmos bioquímicos, fisiológicos y comportamentales, son sincronizados por los ciclos diarios de luz/oscuridad. Además, el

fotoperiodo genera en la naturaleza dos grandes “nichos”, que son ocupados por dos grupos de animales, los diurnos y los nocturnos, a lo que puede añadirse un tercer grupo: los crepusculares.

El mecanismo por el cual el fotoperiodo sincroniza los ritmos biológicos implica la existencia de un oscilador endógeno sensible y sincronizable por la luz (LEO). Esta estructura/s constituye un oscilador autónomo, cuya ritmicidad se mantiene cuando se elimina el fotoperiodo, es decir, en condiciones constantes de luz u oscuridad. En mamíferos, el LEO ha sido localizado anatómicamente en el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo (Meijer y Reitveld, 1989; Cermakian y Sassone-Corsi, 2002). Además, como se ha mencionado anteriormente, esta estructura funciona como un marcapasos central controlado todos los ritmos fisiológicos y comportamentales.

En teleósteos, también se ha demostrado la existencia de un LEO, sin embargo, en este grupo de animales no se ha identificado un reloj central similar al de mamíferos, aunque si existen diversas estructuras que funcionan a modo de osciladores autónomos capaces de transmitir su ritmicidad al resto del organismo, como el órgano pineal.

La sincronización al fotoperiodo implica la existencia de mecanismos de fotorrecepción. En mamíferos, la luz es percibida por la retina y la información lumínica se envía hasta el marcapasos central del núcleo supraquiasmático a través del tracto retino-hipotalámico (TRH). En otras especies, como en aves y peces se ha demostrado que el órgano pineal juega un papel muy importante en la fotorrecepción, siendo capaz de captar señales lumínicas por medio de sus células fotorreceptoras (Meissl y Dodt, 1981; Meissl et al., 1986). Por otro lado, en el caso de *Drosophila* y pez cebra, independientemente de la existencia de estructuras fotorreceptoras, se ha demostrado que todas las células del animal pueden captar directamente la luz (Tamai y Whitmore, 2005), lo que sugiere la posibilidad de una sincronización directa e independiente por el fotoperiodo.

### 3.2. SINCRONIZADORES BIÓTICOS: EL ALIMENTO.

Los animales también son capaces de sincronizar sus ritmos de actividad con los momentos del día en los que la disponibilidad de alimento es mayor y la presencia de depredadores menor. Además, en condiciones de disponibilidad constante de alimento, los animales presentan ritmos de alimentación, alimentándose periódicamente cada cierto tiempo en función de sus ritmos endógenos de actividad.

Pero los ritmos de alimentación van más allá. Cuando el alimento es restringido a determinadas horas del día, es decir se establece un ciclo en la disponibilidad de alimento, los animales sincronizan sus ritmos fisiológicos y de comportamiento para anticiparse a la llegada del alimento. Se ha observado que a los pocos días del establecimiento de un ciclo de alimentación, los animales incrementan su actividad motora, en las horas previas a la llegada del alimento. Este fenómeno se ha llamado Actividad Anticipatoria al Alimento (FAA) y su existencia ha sido demostrada tanto en mamíferos, como en peces (Stephan 2002; Sánchez-Vázquez, 1997; Vera et al., 2007).

El significado biológico de la FAA es obvio, el alimento es un recurso escaso en la naturaleza y su disponibilidad varía espacial y temporalmente. De esta forma, la capacidad de predecir el periodo en el cual el alimento estará disponible, supone una clara ventaja para el animal. Además la FAA implica también una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos que optimizan la digestión y asimilación de nutrientes (Comperatore y Stephan, 1987; Vera et al., 2007).

La FAA es controlada por un oscilador endógeno que es sincronizado por el alimento que se ha denominado “oscilador sincronizable por el alimento” (FEO) (Aschoff, 1896), en contraposición al oscilador entrenado por luz (LEO). Sin embargo, la localización anatómica del FEO continúa siendo un misterio. En mamíferos, el LEO está localizado en el NSQ y las lesiones en esta zona inducen un comportamiento arrítmico en los animales. Sin embargo, la FAA no se ve afectada por estas lesiones, lo que sugiere que el FEO estaría localizado fuera de esta estructura (Stephan et al., 1979a; Stephan et al., 1979b; Stephan, 2002; Mistlberger, 1994).

En peces, la sincronización al alimento parece también estar mediada por un FEO. Sin embargo, también se desconoce la localización anatómica este oscilador, al igual que la

localización del oscilador endógeno sincronizado por luz o LEO. Sin embargo, la existencia de estos dos osciladores ha sido demostrada por varios autores y se ha sugerido que ambos osciladores son independientes aunque están íntimamente acoplados (Sánchez-Vázquez et al., 1997).

#### 4. RELOJES MOLECULARES.

Los relojes moleculares fueron descritos por primera vez en *Drosophila* (Konopka, and Benzer, 1971) y *Neurospora* (Feldman y Hoyle, 1973) y permitieron confirmar el control genético del sistema circadiano, así como el funcionamiento del marcapasos central de mamíferos situado en el NSQ.

En 1971, Ronald J. Konopka y Seymour Benzer, gracias a tres líneas mutantes de *Drosophila* que mostraban ritmos de comportamiento aberrantes (periodo corto, largo y arrítmico), identificaron un componente genético del reloj biológico que se denominó *period* (Young y kay, 2001). Más tarde, el modelo de *Drosophila* permitió que se identificasen otros siete genes (*timeless*, *clock*, *cycle*, *double-time*, *cryptochrome (cry)*, *shaggy (sgg)*, *vri*), que junto a *per* constituyen el núcleo del reloj molecular fotosensible y que fueron denominados **genes reloj** (Young y kay, 2001). A partir de estos genes de *Drosophila*, fueron identificados ortólogos para cada uno de estos genes reloj en diferentes organismos, como en el pez cebra, xenopus, aves, hámster, ratón y humano.

Según el modelo actual, el funcionamiento de los relojes moleculares está basado en la oscilación auto-mantenida de productos génicos a nivel celular a través de un mecanismo de retroalimentación por el cual, los genes reloj regulan su propia expresión. Estos bucles de retroalimentación positiva y negativa están entrelazados y afectan a la transcripción y traducción de dichos genes, generando una expresión rítmica autónoma con un periodo aproximado de 24 h. Además, los genes reloj actúan como factores de transcripción, regulando la expresión de otros muchos genes, llamados genes *clock-regulados*, los cuales en última instancia controlan todos los procesos fisiológicos rítmicos del organismo. Estudios recientes demuestran que la expresión de al menos el 2-10 % del genoma sigue un patrón circadiano (Storch et al., 2002).

Los relojes moleculares, han sido bien caracterizados en *Drosophila* y en ratón, y en caso de los teleósteos, han sido estudiados sobre todo en el pez cebra. En el modelo del reloj molecular de mamíferos, uno de los mejor caracterizados, *clock* y *bmall* activan la transcripción de genes diana, como los genes reloj *Periods* y *Cryptocromos*. Las proteínas CLOCK y BMAL forman dímeros a través de la interacción de dominios PAS (Per-Arnt-Sim) presentes en su estructura, y entran en el núcleo de la célula, donde se unen específicamente al DNA en las secuencias CACGTG (E-box). Estas secuencias están presentes en la región promotora varios genes como los genes *periods* y *los cryptocromos*. La transcripción de los genes reloj *Per* y *Cry* y la salida de los mRNA correspondientes al citoplasma, donde son traducidos, conlleva un cierto retraso. Las proteínas PER1, PER2, PER3, CRY1 y CRY2, se acumulan en el citoplasma y forman homo- y heterodímeros por interacción de los dominios PAS, también presentes en su estructura. En este punto, la dinámica del sistema es regulada a través de modificaciones post-transduccionales, mayoritariamente a través de la fosforilación de las proteínas PER por CK1 $\epsilon$  y CK1 $\alpha$ , promoviendo la ubiquitinación y posterior degradación de estas proteínas en los proteosomas. La fosforilación en sitios específicos de las proteínas también actúa como señales de localización celular. Esto hace que la entrada de los heterodímeros PER:CRY en el núcleo este retrasada (Agostino et al. 2008, Lee et al. 2001, Lowrey et al. 2000, Akashi et al. 2002). En el núcleo los heterodímeros PER:CRY inhiben la transcripción mediada por CLOCK:BMAL a través de un mecanismo que implica la acetilación de histonas y otras modificación de la cromatina (Etchegaray et al. 2003). Esta inhibición deja de actuar al disminuir la concentración de PER:CRY, iniciándose un nuevo ciclo. *Clock* y *bmall* forman parte también de un bucle auxiliar, el cual activan la transcripción de REV-ERB $\alpha$  y ROR $\alpha$ , los cuales a su vez regulan la transcripción de *clock* y *bmall*. Estos bucles de retroalimentación entrelazados tardan unas 24 horas en completar un ciclo y constituyen la base del funcionamiento de los relojes moleculares (Sumová et al., 2008).

En teleósteos existen algunas diferencias respecto a mamíferos (Fig.2). Por ejemplo, el gen *clock* de peces exhibe una expresión circadiana, mientras que en mamíferos este gen es expresado constitutivamente (Shearman et al.1999). En el pez cebra también han sido identificados homólogos para los tres genes *periods* de mamíferos, pero a diferencia de mamíferos *per2* es inducido y regulado por luz y no presenta un ritmo circadiano en condiciones lumínicas constantes. En cambio, en mamíferos, los tres genes *periods*: *per1*, *per2* y *per3*

presentan ritmicidad en estas condiciones. Por otro lado, en el pez cebra se han identificado al menos 6 genes que codifican para criptocromos. En general, aparecen dos parálogos para cada uno de los genes presentes en mamíferos. Entre ellos, *cry1a*, *cry1b*, *cry2a* y *cry2b* pueden inhibir a los dímeros CLOCK/BMAL, mientras que *cry3* y *cry4* no son capaces de inhibir estos dímeros. Además, las acrofases de los criptocromos difieren entre los diferentes subtipos, sugiriendo que no tienen funciones redundantes (Cahill, 2002).

Estudios recientes sugieren que el mecanismo de los relojes biológicos podría ser mucho más complejo y es posible que el modelo actual, descrito previamente, solo explique en parte el funcionamiento de los relojes circadianos. Cada vez existen más evidencias sobre la implicación de otros muchos genes en el funcionamiento de los relojes moleculares, y es probable que existan otros mecanismos adicionales que no han sido considerados en este modelo (Sumová et al., 2008).

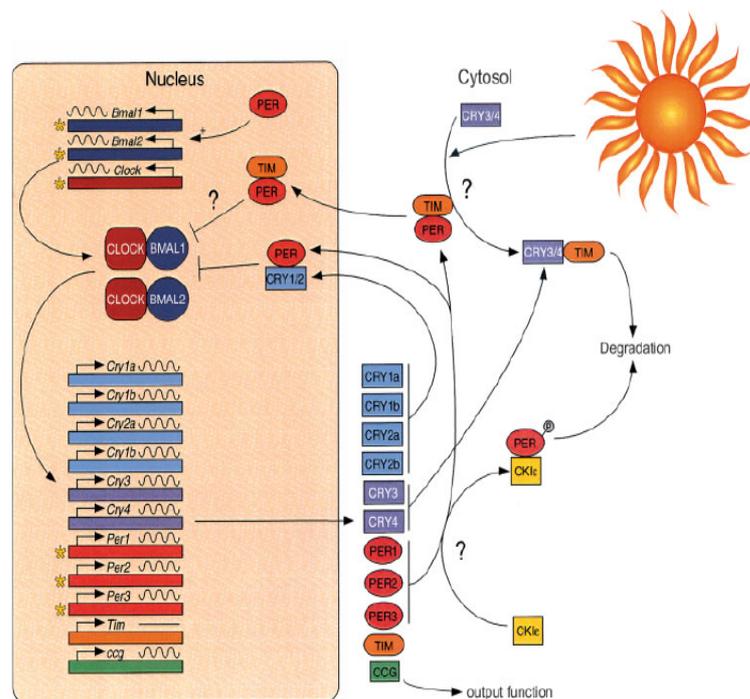


Figura 2. Modelo de funcionamiento del reloj biológico molecular de teleosteos. El heterodímero CLOCK:BMAL activa la transcripción de los genes *Cry* y *Per*. Las proteínas CRYs son responsables de la regulación negativa del ciclo y los estímulos fóticos podrían actuar también a través de las proteínas CRY. (Modificada de Pando and Sassone-Corsi, 2002).

#### **4.1 EVOLUCIÓN GENÓMICA Y RELOJES MOLECULARES.**

Es probable que los relojes moleculares surgieran en organismos unicelulares ancestrales, apareciendo actualmente en casi, si no todos, los phylum conocidos. En general, los genes reloj de vertebrados presentan un alto grado de homología, lo que sugiere un origen evolutivo común. Además, el estudio de estos genes desde un punto de vista filogenético, apoya la hipótesis de que han existido varios episodios de duplicación genómica, tanto en el origen de vertebrados, como en el origen de teleósteos (Wang, 2008; Wang, 2009). Al igual que en otros genes, estas duplicaciones generaron la presencia de varios homólogos para cada uno de los genes reloj presentes en invertebrados. De manera que en los diferentes taxones aparecen tanto homólogos/parálogos, como homólogos/ortólogos de los genes que componen el núcleo del reloj molecular de *Drosophila*. Además, es frecuente encontrar en muchos grupos taxonómicos, que parte de estos genes reloj “duplicados” han desaparecido o bien se encuentran en forma de pseudogenes. Sin embargo, también es común, sobre todo en el caso de teleósteos, que se hayan conservado varios homólogos de cada uno de los genes reloj de invertebrados. La conservación de varias “copias” del mismo gen se explica probablemente, debido a la adquisición de nuevas funciones o a la especialización de cada uno de ellos en diferentes aspectos del mecanismo de funcionamiento de los relojes biológicos. Otra posibilidad que se ha sugerido, es que estos genes “duplicados” constituyen vías moleculares paralelas que realizan una función similar o al menos muy semejante. En resumen, la existencia de varias ‘copias’ de cada uno de los genes reloj, tanto en mamíferos como en teleósteos, es debida a duplicaciones del genómicas. Estas duplicaciones tuvieron lugar en organismos ancestrales “coincidiendo” con la aparición de los cordados y de los teleósteos.

#### **4.2. ONTOGENIA DE LOS RELOJES MOLECULARES**

La ontogenia de los relojes moleculares ha sido bastante estudiada en mamíferos, donde se ha demostrado que los genes reloj comienzan a expresarse en etapas muy tempranas del desarrollo, incluso antes de la fecundación, siendo las señales sincronizadoras maternas, como los ritmos de melatonina, muy importantes en la sincronización de los relojes biológicos y del sistema circadiano en general (Seron-ferre et al., 2007). En peces, aunque este aspecto es menos

conocido, también se ha mostrado que los genes reloj comienzan a expresarse en etapas muy tempranas del desarrollo, incluso antes de la fecundación (Delaunay et al., 2000).

El pez cebra, ha sido utilizado tradicionalmente como un modelo para estudiar el desarrollo embrionario de vertebrados, ya que presenta algunas características ideales, como un desarrollo rápido y la transparencia sus embriones. En el pez cebra, la puesta/fecundación tiene lugar próxima al encendido de las luces (Blanco-Vives, 2009) y la eclosión ocurre normalmente durante el tercer día post-fertilización. En general, las larvas son inactivas durante los primeros cuatro días post-eclosión y sobre el quinto día, las larvas comienzan a nadar y alimentarse (Granato et al., 1996, Hund y Cahill, 2002). Existen otras especies de teleósteos, como la lubina, con un desarrollo comparable. En esta especie la eclosión tiene lugar aproximadamente el tercer día post-fertilización y las larvas comienzan a alimentarse a partir del sexto día aproximadamente, aunque estos datos pueden variar en función de las condiciones ambientales, especialmente de la temperatura (Ronnestad et al., 1998; Hatzithanasiou et al., 2002). Por el contrario otras especies, como la trucha arcoíris presentan un desarrollo mucho más lento, con largos periodos de incubación.

Utilizando el modelo del pez cebra, se ha determinado la presencia de transcritos del gen reloj *per3* en huevos sin fecundar (Delaunay et al., 2000). Estos hallazgos llevaron a postular que la fase de los ritmos, era transmitida vía materna, de manera que de forma similar a los mamíferos, las señales maternas jugarían un papel importante en el establecimiento y sincronización de los relojes biológicos, siendo las señales ambientales poco importantes (Seron-ferre et al., 2007). Sin embargo, los estudios más recientes demuestran que en el pez cebra, la exposición al fotoperiodo, es necesaria para iniciar los ritmos circadianos tanto a nivel de comportamiento, como fisiológicos y moleculares (Hurd y Cahill, 2002; Cahill, 2002; Kaneko y Cahill, 2005; Ziv y Gothilf, 2006; Vallone et al., 2007).

Bajo LD, las larvas de pez cebra inician sus ritmos de comportamiento a partir del cuarto día aproximadamente, tan pronto como éstas comienzan a nadar y alimentarse. Mientras que bajo condiciones constantes de oscuridad las larvas son arrítmicas al (Hurd y Cahill, 2002; Cahill, 2002). A nivel fisiológico, también se ha demostrado que el fotoperiodo induce la aparición de un ritmo de melatonina en embriones de pez cebra a partir de la segunda noche post-eclosión, lo que coincide con la aparición de un ritmo en la expresión de *Aanat2*. Además,

ambos ritmos se mantienen cuando se transfieren las larvas a DD (Gothilf et al, 1999, Kazimi y Cahill, 1999). A nivel molecular, Kaneko y Cahill (2005), demostraron que el inicio de un ritmo de expresión en el gen *per3* de pez cebra tiene lugar a partir del 5-6 día, lo que requiere de la presencia de un fotoperiodo a partir del 4 día, mientras que bajo DD, este gen no muestra ritmos al menos durante los primeros 11 días post-eclosión. Resultados similares se han obtenido para *per1*, cuya expresión rítmica aparece a partir del segundo día post-eclosión en larvas de pez cebra, bajo LD y no bajo DD (Dekens y Whitmore, 2008; Lahiri et al, 2005).

El efecto de la luz, implica la presencia de mecanismos de fotorrecepción en los embriones. La pineal es el primer órgano fotorreceptor que se desarrolla en el pez cebra. Este órgano contiene un oscilador circadiano intrínseco que conduce los ritmos de melatonina y además, es capaz de recibir y sincronizarse a la luz, incluso en cultivos *in vitro* (Ziv y Gothif, 2006). Kazimi y Cahill (1999) mostraron que en el pez cebra, este órgano comienza a ser funcional y fotosensible en el segundo día post-eclosión, mientras que la retina comienza a ser fotosensible más tarde, a partir del tercer día post-eclosión (Neuhauss et al., 2003; Kaneko y Cahill, 2005). Así pues, a partir del 2 día post-eclosión (Cahill, 2002), los pulsos de luz o el establecimiento de un fotoperiodo inician o sincronizan los ritmos circadianos de actividad locomotora, melatonina plasmática y expresión de genes reloj (Hurd y Cahill, 2002, 1998; Hurd y Cahill, 2002; Kazimi and Cahill, 1999; Cahill, 2002; Dekens et al., 2003; Kaneko and Cahill, 2005; Lahiri et al., 2005; Dekens y Whitmore, 2008).

Curiosamente, antes del desarrollo de la pineal, a partir de las 10 horas post-fertilización, los pulsos de luz inducen la expresión transitoria del gen reloj *per2* y la aparición de los ritmos de expresión de *aanat2* en pineal más tarde, a partir del segundo día post-fertilización (Ziv y Gothilf, 2006). Estos hallazgos sugieren la existencia de mecanismos de fotorrecepción independientes de la pineal y retina. En este sentido, en el pez cebra se ha demostrado que los relojes periféricos, presentes en muchos tejidos diferentes, se sincronizan directamente a la luz (Whitmore et al., 2000; Pando y Sassone-Corsi, 2002). Sin embargo, la molécula o pigmento que actúa como fotorreceptor circadiano no sido identificada, pero algunos autores apuntan hacia los criptocromos, los cuales actúan como fotorreceptor en *Drosophila* (Cermakian et al., 2002; Vallone et al., 2007). Alternativamente, la opsina TMT (*Teleost multiple tissue opsin*) también se ha propuesto con fotorreceptor circadiano, ya que es expresada ubicuamente en pez

cebra (Moutsaki et al., 2003; Vallone et al., 2007). Sin embargo, la transmisión de esa ritmicidad al resto del organismo es atribuida solo a determinados tejidos, generalmente neuronales, como la pineal.

La importancia o significado biológico de la maduración temprana de relojes moleculares, es relativamente desconocida. Se han descrito ritmos circadianos de división celular en pez cebra (Dekens et al., 2003), que aparecen tan pronto como los relojes moleculares comienzan a funcionar (4 d.p.f.) y se ha propuesto que su función es la sincronización de la fase S de la mitosis a los momentos del día con menor radiación UV, lo cual podría ser una ventaja adaptativa (Vallone et al., 2007). En este sentido, los ritmos de secreción de melatonina también han sido implicados en la estimulación de la proliferación celular (Danilova et al., 2004), sincronizando la síntesis de DNA en los momentos del día con menor radiación UV. Además, es posible que los relojes biológicos actúen regulando procesos del desarrollo que deben ocurrir con un orden temporal correcto. Por otro lado, se han atribuido funciones importantes a los genes reloj en el desarrollo embrionario, no relacionadas con los ritmos circadianos, encontrándose incluso que ciertas mutaciones en estos genes son letales debido a un desarrollo anormal (Vallone et al., 2007). Además, en *Xenopus* los genes reloj son expresados solo en determinados tejidos en desarrollo y de forma arrítmica sugiriendo una posible función de estos genes en el desarrollo (Curran et al., 2008). En adición, también se ha observado la transferencia al cigoto de transcritos maternos de los genes *per2* y *per3*, en pez cebra y *clock* y *bm11*, en mamíferos (Vallone et al., 2007).

En resumen, en teleósteos los sincronizadores ambientales juegan un importante papel para el correcto desarrollo de los relojes moleculares. Sin embargo, el papel éstos relojes moleculares durante el desarrollo embrionario es poco conocido, aunque existen algunas evidencias que sugieren que podría tener un papel regulador importante en estas etapas.

## 5. BIOLOGÍA DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS.

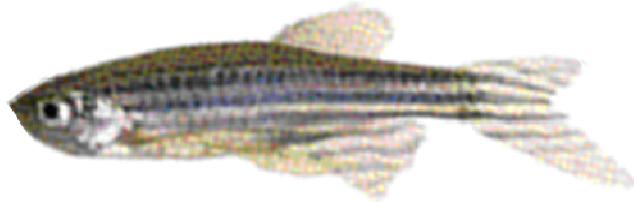
### 5.1 *Danio rerio* (Hamilton, 1822).

En los últimos años el pez cebrá ha adquirido una enorme importancia en la investigación de diferentes aspectos de la biología de vertebrados, como por el ejemplo: el desarrollo embrionario, cáncer, biología molecular e inmunología de vertebrados etc. Esta especie resulta muy atractiva para su utilización como organismo modelo debido sus características: alta fecundidad, bajo tiempo de generación (unos 3-4 meses), sencillas condiciones de mantenimiento, transparencia de los embriones y larvas que permiten una fácil visualización de la morfología y movimiento celular, etc. Los *screening* genéticos a gran escala en esta especie también han sido bastante fructíferos. Además, el alto grado de homología entre el genoma del pez cebrá y el humano, hace a esta especie muy adecuada para el estudio del desarrollo y enfermedades humanas. (Postlethwait et al., 2000). Por otro lado, varios grupos de investigación internacionales de gran prestigio han enfocado su atención sobre esta especie para el estudio de los ritmos biológicos y los mecanismos moleculares que actúan en los relojes biológicos (Whitmore et al., 2000; Foulkes y Sassone-Corsi, 2000; Pando y Sassone-Corsi, 2002; Cahill, 2002).

Descripción morfológica: El pez cebrá pertenece a la familia Ciprinidae. Presenta un cuerpo fusiforme comprimido lateralmente, en cuyo dorso aparecen de 5 a 7 líneas pigmentadas azules oscuras que se extienden desde los opérculos hasta la aleta caudal. En general, los adultos pueden alcanzar unos 3,8 cm de longitud (Fig. 3).

Biología: Es una especie omnívora, que se alimenta generalmente de gusanos, pequeños crustáceos y larvas de insectos, aunque el fitoplancton, las algas y las plantas también pueden formar parte de su dieta. Presenta dimorfismo sexual: las hembras son de mayor tamaño y difieren en los patrones de pigmentación. El desove es inducido por la temperatura, aunque también se ve afectado por la disponibilidad de alimento y suele comenzar con el inicio de la temporada del monzón. Los huevos no son flotantes y son liberados sobre el sustrato. Su vida media es de unos 3.5 años y puede alcanzar como máximo aproximadamente 5.5 años.

Hábitat y distribución: Es un especie bentopelágica de agua dulce que se encuentra generalmente en aguas con poco movimiento como en riachuelos de laderas, canales, campos de arroz etc. Se distribuye principalmente por Asia: Pakistán, India, Bangladesh, Nepal y Myanmar. También ha sido encontrado en aguas de Colombia, presumiblemente introducido, ya que esta especie ha sido introducida en todo el mundo como una especie ornamental de acuario.



*Figura 3. Danio rerio.*

## **5.2 Sparus aurata (Linnaeus, 1758)**

Descripción morfológica: La dorada pertenece a la familia Sparidae. Esta especie tiene un cuerpo fusiforme alto o de forma ovalada y comprimido lateralmente. Presenta escamas cicloides y una línea lateral aparente. La cabeza es grande, convexa y comprimida lateralmente, con una boca pequeña en posición inferior y ojos pequeños. El color de la dorada es gris plateado con una mancha oscura redondeada al inicio de la línea lateral que cubre también parte del opérculo. Entre los ojos presenta una banda dorada y negra. La aleta anal tiene radios espinosos, al igual que dorsal que presenta una parte anterior espinosa y otra posterior de radios blandos. Las pelvianas son pequeñas y torácicas, mientras que las pectorales son largas y puntiagudas y la caudal es escotada. Puede alcanzar unos 70 cm de longitud total y unos 17 kg de peso (Fig. 4).

Biología: Es una especie eurihalina, que se adapta bien a grandes rangos de salinidad. Tiene una alimentación variada que depende de la edad, zona y época del año, siendo mayoritariamente carnívora (moluscos bivalvos, crustáceos, algas macrófitas, anélidos). En cuanto a su reproducción, es una especie hermafrodita protándrica, madurando como macho el

primer o segundo año de vida y después como hembra. A principios de primavera migra hacia aguas costeras y a finales de otoño regresa a mar abierto donde se reproduce. El desove ocurre normalmente en los meses de octubre a diciembre. Los huevos son pelágicos y tienen una gota de aceite que incrementa su flotabilidad. En general, presenta un comportamiento diurno, aunque se han descrito ciertos cambios estacionales en su patrón de comportamiento, ya que su actividad durante el día disminuye en los meses de invierno (Velázquez et al., 2004).

Hábitat y distribución: Vive en aguas marinas sobre fondos arenosos y rocosos. Durante las primeras etapas de vida suele habitar en lagunas costeras y estuarios. Los juveniles permanecen a baja profundidad, mientras que los adultos pueden encontrarse hasta una profundidad máxima de unos 150 m. Es una especie común en el mar Mediterráneo y en el océano Atlántico oriental.

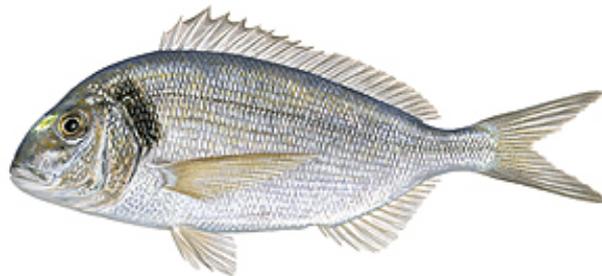


Figura 4. Representación de la dorada (*Sparus aurata*)

### **5.3 *Dicentrarchus labrax*, (Linnaeus, 1758)**

La lubina es una especie perteneciente a la familia Moronidae, muy importante en la acuicultura mediterránea. Desde el punto de vista de la cronobiología, posee la habilidad de invertir sus patrones de comportamiento bajo condiciones ambientales naturales. En invierno, muestra una actividad alimentaria nocturna, mientras que el resto del año presenta una actividad diurna (Sánchez-Vázquez et al., 1998). Curiosamente, en condiciones de laboratorio, con fotoperiodo y temperatura constantes, también se han observado estas inversiones de comportamiento (Sánchez-Vázquez et al., 1995).

Descripción morfológica: Llega a alcanzar un metro de longitud y hasta unos 30 años de vida. Presenta un cuerpo fusiforme con dos aletas dorsales, la primera con 8 ó 9 radios duros y la segunda sólo uno. Las aletas están bien adaptadas a la natación, siendo la aleta caudal ancha y ligeramente ahorquillada mientras que las aletas ventrales, situadas detrás de las pectorales, son mucho menores. La cabeza es puntiaguda, con ojos y aperturas nasales pequeños y una boca amplia con alto grado de prognatismo. Su color es gris plateado, más oscuro en las porciones laterales y blanco en la región ventral (Fig. 5).

Biología: La lubina es una especie marina de carácter euritermo y eurihalino. Los juveniles pasan los primeros años de vida en estuarios (Kelly, 1988), donde la salinidad es relativamente baja. En estos primeros años de vida suele vivir en cardúmenes. En la edad adulta es considerada una especie costera que permanece casi siempre en aguas superficiales. Su alimentación es principalmente carnívora, compuesta normalmente de peces pequeños, crustáceos y moluscos cefalópodos. Los sexos están separados y aunque no existe un dimorfismo sexual aparente, las hembras crecen más deprisa y alcanzan la madurez sexual a los tres años, mientras los machos lo hacen a los dos años, aunque en cautividad pueden alcanzar la madurez sexual bastante antes (Asturiano et al., 2000). Las puestas tienen lugar de diciembre a marzo y suelen ser de unos 150.000 huevos por kg de peso. Los huevos son de forma esférica, transparentes y con gotas lipídicas que les confieren un coloración amarillenta, son pelágicos y flotan durante el período de incubación.

Hábitat y distribución: Es una especie litoral pelágica que habita normalmente en fondos arenosos, fangosos o pedregosos, hasta unos 100 metros de profundidad. Se distribuye principalmente por el Mediterráneo, Mar Negro y Océano Atlántico oriental hasta el Mar del Norte y el Mar Báltico.



Figura. 5. Lubina (*Dicentrarchus labrax*).

#### **5.4 *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792).**

Descripción morfológica: La trucha “arco iris” pertenece a la familia Salmoniade. Tiene un cuerpo alargado, algo comprimido y moteado, con pequeñas manchas negras y muestra una banda lateral irisada que recorre todo el cuerpo. No suele exceder de 60 cm de longitud total y tiene de 3 a 4 espinas en la aleta dorsal (Fig. 6).

Biología: Es un pez carnívoro, cuya alimentación se basa fundamentalmente en larvas de invertebrados y en peces de pequeño tamaño. La reproducción tiene lugar entre enero y marzo, aunque depende de la latitud. Es un pez de aguas subtropicales a frías y algunas poblaciones son anádromas y viven en el mar cerca del fondo en un rango de profundidades entre 0 y 200 metros, remontando los ríos para desovar. Es una especie pelágica aunque los alevines más pequeños son bentopelágicos. El hábitat natural de la especie es el agua dulce de unos 12 °C en verano, no estando claro si la aparición de la anadromía es una adaptación genética o simplemente un comportamiento oportunista, lo que sí parece claro es que cualquier población de esta especie es capaz de emigrar al mar en cualquier momento que lo necesiten, siendo capaces de adaptarse a todo tipo de aguas. Los anádromos suelen vivir unos 11 años, remontando los ríos por primera vez a reproducirse en el tercer año de vida, por lo que suelen reproducirse unas 8 veces en la vida; los no anádromos suelen vivir un máximo de 6 años, reproduciéndose por tanto 3 veces en la vida (Riva-Rossi et al., 2007).

Hábitat y distribución: Es un pez eurihalino de agua dulce y de marina, distribuido de forma nativa por el norte del océano Pacífico, desde el Japón pasando por el mar de Bering hasta Península de Baja California, en México, aunque de forma artificial ha sido introducida por el hombre gran parte de las aguas del planeta (Gall y Crandell, 1992).



*Figura. 6: Trucha arcoiris (Oncorhynchus mykiss).*

## **II. OBJETIVOS**



El objetivo general de esta tesis doctoral es el estudio del funcionamiento de los relojes biológicos moleculares en teleósteos y su sincronización a los ciclos diarios de fotoperiodo y alimentación.

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1. Clonar el gen reloj *per1* de lubina, estudiar la distribución de su expresión y analizar su expresión rítmica a lo largo de 24 horas en tejidos nerviosos y en tejidos periféricos.
2. Estudiar el efecto del fotoperiodo y de diferentes longitudes de onda del espectro lumínico sobre la ontogenia del ritmo de expresión del gen *per1*, en larvas de lubina (de 0 a 5 días post-fertilización).
3. Estudiar la ontogenia de los relojes biológicos moleculares durante en el desarrollo embrionario temprano de la trucha arcoíris, un modelo con un largo periodo de incubación, bajo diferentes fotoperiodos.
4. Determinar el efecto sincronizador de los ciclos de alimentación sobre la expresión de los genes reloj y sobre los ritmos de actividad motora en el pez cebra.
5. Estudiar el efecto de la alimentación periódica, frente a la aleatoria, sobre los ritmos de comportamiento, crecimiento e indicadores de estrés en dorada.



## **III. CAPÍTULO EXPERIMENTALES**



### **III.I. RELOJES MOLECULARES Y ONTOGENIA.**



## 1. CLONACIÓN DEL GEN *PER1* EN LUBINA.

**Clonación, ritmos de expresión diaria y distribución por tejidos del gen *per1* de lubina (*Dicentrarchus labrax*)<sup>1</sup>**

Sánchez J.A.\*, Madrid J.A. and Sánchez-Vázquez F.J.

Departamento de Fisiología, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, 30100, Murcia,  
España.

*Este trabajo ha sido publicado en la revista: **Chronobiology International**, 27(1): 1–15, (Junio, 2010)*

---

<sup>1</sup> La secuencia de nucleótidos ha sido enviada a la base de datos del Gen-bank y le ha sido asignado el número de acceso GQ353293.



**RESUMEN**

La principal característica de los ritmos circadianos es su origen endógeno, originado por la existencia de osciladores moleculares autónomos denominados relojes moleculares. Los relojes moleculares están formados un grupo de genes llamados genes reloj y por sus productos, los cuales interaccionan entre sí formando bucles de retroalimentación que regulan la expresión rítmica de estos genes. La familia *Period* es un grupo de genes reloj esenciales para el funcionamiento de los relojes moleculares. En este estudio se ha clonado un gen *period 1* (*per1*) de lubina, un teleósteo marino de alto interés en cronobiología. La secuencia obtenida codifica para una proteína de 1436 aminoácidos que presenta una alta homología con otras proteínas Per1 de teleósteos, teniendo la mayor identidad con la proteína Per1 de Medaka. El análisis de la expresión génica mostró que el gen *per1* de lubina es expresado en todos los tejidos que fueron analizados (cerebro, corazón, hígado, branquias, músculo, tracto digestivo, tejido adiposo, bazo, y retina). Además, *per1* mostró un ritmo de expresión circadiana con una acrofase o pico de expresión a ZT0 (próximo al encendido de la luces) tanto en tejidos nerviosos (cerebro), como en tejidos periféricos (hígado y corazón). En conclusión, la identificación y caracterización del gen *per1* de lubina, proporciona una valiosa información para dilucidar los mecanismos moleculares que regulan el sistema circadiano de esta especie. Futuros estudios podrán determinar el papel que juega este gen en el sistema circadiano de esta especie, así como su posible implicación en las inversiones de comportamiento de esta especie.

**Keywords:** Period, Per1, Sea bass, Clock genes, Circadian rhythms.

## INTRODUCCIÓN

Los ritmos circadianos son generados, regulados y mantenidos a través de bucles de retroalimentación autorregulados, que están formados por la internación de un grupo de genes reloj y de las proteínas codificadas por ellos (Ko & Takashi, 2006; Yu & Hardin, 2006; Wang, 2008; Dardente & Cermakian, 2007). Los genes reloj fueron identificados por primera vez en *Drosophila melanogaster* (Konopka & Benzer, 1971; Bargiello et al., 1984; Reddy et al., 1984). Más tarde, los genes reloj fueron descritos en una gran diversidad de organismos, lo que puso de manifiesto que estos genes están evolutivamente muy conservados (Dunlap, 1999; Panda et al., 2002; Tauber et al., 2004; Bell-Penderson et al., 2005; Wang, 2008). Hasta la fecha, los genes reloj han sido muy estudiados en mamíferos (Albrecht et al., 1997; Shearman et al., 1997; Sun et al., 1997; Tei et al., 1997; Dardente & Cermakian, 2007), sin embargo, algunas especies de teleósteos, como el pez cebra, representan un modelo de particular interés para el estudio de los relojes moleculares (Cahill, 2002; Pando & Sassone-Corsi, 2002).

La familia de proteínas PERIOD (PER) pertenece a la superfamilia denominada PAS (PER-ARNT-SIM), la cual ha sido descrita como un grupo de proteínas que actúan como sensores a nivel celular (Kewley et al., 2004). En adición, las proteínas PER son componentes esenciales en los relojes moleculares de *Drosophila* y de vertebrados (Numano et al., 2006; Yildiz et al., 2005). Algunas mutaciones en estos genes provocan efectos drásticos en el periodo y estabilidad de los ritmos circadianos (Baylies et al., 1992; Huang et al., 1995; Albrecht et al., 2001; Bae et al., 2001; Zheng et al., 2001; Pando et al., 2002; Grima et al., 2004). Por otro lado, se ha demostrado que la regulación de la función de las proteínas PER tiene lugar por cambios en la síntesis, fosforilación, localización subcelular e interacciones específicas con otras proteínas/genes que forman parte de los relojes moleculares (Yildiz et al., 2005).

En teleósteos, los genes reloj han sido estudiados sobre todo en el pez cebra (Whitmore et al., 1998; Cermakian et al., 2000; Delaunay et al., 2000, 2003; Kobayashi et al., 2000; Pando et al., 2001; Vallone et al., 2004; Ziv & Gothilf, 2006), aunque también han sido descritos en otras especies de teleósteos como *Siganus guttatus* (Rabbitfish) (Park et al., 2007), *Takifugu rubripes* (Fugu), *Tetraodon nigroviridis* (“spotted green pufferfish”), *Oryzias latipes* (Medaka), y *Gasterosteus aculeatus* (espinoso) (Wang, 2008). Sin embargo, hasta la fecha, la secuencia completa del gen *per1* no había sido descrita en ninguna especie de interés en acuicultura. Los

estudios en el pez cebra han puesto de manifiesto que su sistema circadiano y sus relojes moleculares difieren en algunos aspectos de los de mamíferos. En primer lugar, en el pez cebra, todas las células son capaces de detectar la luz (Tamai et al., 2005), además, no han sido descritos relojes centrales similares al presente en el núcleo supraquiasmático de mamíferos (Cahill, 2002; Pando & Sassone-Corsi, 2002), y por último, los genes reloj presentan varios homólogos/parálogos para cada uno de los genes reloj presentes en los relojes de mamíferos que probablemente fueron generados por duplicaciones genómicas (Wang, 2008).

La lubina Europea, *Dicentrarchus labrax*, es una especie de teleosteo marino muy utilizado en estudios cronobiológicos, debido a que presenta la capacidad de invertir sus patrones de comportamiento. Bajo condiciones naturales de temperatura y fotoperiodo, esta especie muestra un comportamiento nocturno en invierno y diurno el resto del año (Sánchez-Vázquez et al., 1998). Además, algunos estudios previos han revelado que sus ritmos de alimentación y comportamiento son endógenos y que las inversiones de comportamiento pueden aparecer también bajo condiciones constantes de fotoperiodo y temperatura, de manera que un mismo individuo puede pasar de diurno a nocturno y viceversa (Sánchez-Vázquez et al., 1995). Por otro lado, los ritmos diarios de melatonina también han sido estudiados en esta especie, bajo condiciones de laboratorio, mostrando perfiles diarios inversos en plasma y en retina (Sánchez-Vázquez et al., 1997; Ligo et al., 1997; García-Allegue et al., 2001), los cuales son influenciados por las condiciones lumínicas y por la temperatura del agua (Bayarri et al., 2002). Así pues, esta especie representa un interesante modelo para estudiar los mecanismos moleculares implicados en el control de los ritmos circadianos.

El objetivo de este estudio fue sentar las bases que permitan investigar la regulación a nivel molecular de los relojes biológicos y el sistema circadiano de la lubina. Para ello, se clonó el gen *per1* y se analizó su expresión en diferentes tejidos. Además, se estudiaron los ritmos diarios de expresión de *per1* tanto en tejidos nerviosos (cerebro), como tejidos periféricos (hígado y corazón).

## MATERIAL AND MÉTODOS

### **Mantenimiento de los animales.**

Todos los procedimientos de este estudio fueron realizados bajo las normas de la legislación española sobre bienestar animal y buenas prácticas de laboratorio. Además, los protocolos experimentales fueron diseñados conforme a estándares éticos internacionales (Portaluppi et al., 2008).

Un total de 40 individuos de lubina europea, como un peso medio de  $400 \pm 52$  g (mean  $\pm$  S.D.), fueron obtenidos de una empresa de acuicultura local. Los animales fueron mantenidos en dos tanques de 500 litros en el laboratorio de acuicultura de la Estación Naval de Algameca (ENA, Murcia, España) bajo un sistema de recirculación abierta y con una temperatura constante de 20°C. El fotoperiodo fue 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, con el encendido de luces a las 09:00 h (ZT0). Durante la fase de luz, la intensidad lumínica fue de aproximadamente 300 lux. Después de dos semanas bajo estas condiciones, se obtuvieron muestras cada tres horas a lo largo de un día completo (a ZT0, ZT3, ZT6, ZT9, ZT12, ZT15, ZT18, y ZT21). En cada punto de muestreo se sacrificaron 5 animales, bajo las condiciones lumínicas de la fase correspondiente. En la fase de oscuridad las muestras se obtuvieron utilizando una luz roja débil. Los peces fueron anestesiados y sacrificados y se obtuvieron muestras de cerebro, hígado y corazón. Además a ZT0 y ZT12 se obtuvieron muestras de retina, agallas, musculo, tejido adiposo, bazo. Todas las muestras fueron almacenadas a -80°C en TRIzol® (Invitrogen) hasta su posterior análisis.

### **Clonación**

Para amplificar un fragmento de cDNA del gen *per1* de lubina, se diseñaron primers degenerados (5'-TTYCAGCARATCTGYAA-3' y 5'-CARTTRATCTGCTGRTA-3'), en base a regiones conservadas del gen, identificadas mediante el alineamiento de secuencias de mRNA de genes homólogos de varias especies de vertebrados. El cDNA fue sintetizado a partir de 1 µg de RNA total extraído de homogenados de cerebro de lubina, utilizando Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La amplificación por

PCR consistió en 35 ciclos de desnaturalización (30 s a 94°C), alineamiento (30 s a 55°C), y extensión (1 min a 72°C). Los productos de PCR obtenidos fueron clonados en el vector pGEM-T (Promega) y secuenciados. Una vez confirmada la identidad de los fragmentos de cDNA secuenciados mediante BLAST, estas secuencias fueron utilizadas para el diseño de primers con el fin de obtener la secuencia completa mediante PCR-RACE utilizando el kit SMART RACE cDNA amplificación kit (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA) según las instrucciones del fabricante. Se diseñaron primers específicos y se realizaron dos rondas de PCR, la primera fue llevada a cabo con el siguiente programa: 5 ciclos de 94°C durante 5 s, 72°C durante 3 min; 5 ciclos a 94°C durante 5 s, 70°C durante 10 s, y 72°C durante 3 min; y 25 ciclos a 94°C 5 s, 68°C 10 s, and 72°C durante 3 min. A continuación se realizó una PCR nested de 25 ciclos con las siguientes condiciones 94°C 5 s, 68°C 10 s, y 72°C 3 min. Los fragmentos de cDNA amplificados fueron clonados en el vector TOPO-TA (Invitrogen) y secuenciados por el método de los dideoxinucleótidos.

### **Análisis de la secuencia**

La secuencia de cDNA y la secuencia deducida de aminoácidos fue analizada y comparada con secuencias relacionadas obtenidas del GenBank, utilizando el programa BLAST (National Center for Biotechnology Information, NIH, USA). Los dominios estructurales de la proteína fueron identificados utilizando el programa SMART (Schultz et al., 1998; Letunic et al., 2006) (<http://www.smart.emblheidelberg.de/>) y ScanProsite (<http://expasy.org/tools/>). Se realizaron alineamientos múltiples con otras proteínas PER de vertebrados utilizando ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) con los siguientes parámetros: gap open penalty=10, gap extension penalty=0.05, gap distance=8. El análisis filogenético se realizó con el paquete PHYLIP 3.68 (Felsenstein, 1989). El bootstrap-análisis fue realizada usando 1000 replicas generadas con el programa SEQBOOT. Las distancias fueron calculadas con el programa PROTDIST utilizando la matriz JTT, y las matrices de distancia calculadas fueron usadas para generar 1000 árboles, utilizando el programa NEIGHBOR. El árbol filogenético consenso fue calculado con el algoritmo CONSENSE. El fenograma sin raíz fue representado con el programa TreeView (versión 1.40). Los números de acceso o IDs de los transcritos/proteínas utilizados en el análisis filogenético fueron los siguientes: *NP\_525056*

(*Drosophila PER*); NP\_002607 (*Human PER1*); NP\_073728 (*Human PER2*); NP\_058515 (*Human PER3*); NP\_035196 (*Mus PER2*); NP\_001152839 (*Mus PER1*); NP\_035197 (*Mus PER3*); NP\_001029297 (*Ratus PER1*); NP\_113866 (*Rattus PER2*); NP\_076468 (*Rattus PER3*); NP\_001079172 (*Xenopus PER1*); NP\_001081098 (*Xenopus PER2*); NP\_001025354 (*Zebrafish PER1a*); NP\_997604 (*Zebrafish PER1b*); NP\_878277 (*Zebrafish PER2*); NP\_571659 (*Zebrafish PER3*); NP\_001129992 (*Medaka PER1*); ENSORLP00000019352 (*Medaka PER2b*); ENSORLP00000020793 (*Medaka PER2a*) y ENSORLP00000019968 (*Medaka PER3*).

### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Las muestras de tejidos fueron homogeneizadas en TRIzol® usando un homogeneizador (Polytron®, PT1200, Kinematica, Switzerland) y procesadas usando el kit PureLink Micro-to-Midi Systems (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante. Se determinó la concentración de RNA y 1 µg fue tratado con DNasa I para prevenir la contaminación por DNA genómico. La síntesis de cDNA fue realizada con Superscript III Reverse Transcriptase y Random primers (Invitrogen) en un volumen de reacción de 20 µl. La PCR en tiempo real fue realizada utilizando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) y ABI Prism 7500 (Applied Biosystems). El programa ABI Sequence Detection System 7000 software (Applied Biosystems) fue programado con el siguiente protocolo: 95°C-10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C - 15 s, y 60°C - 1 min. La amplificación se llevó a cabo en un volumen de 20 µl. Todas las muestras fueron amplificadas por triplicado. Los primers fueron diseñados con el programa Primer Express software (Applied Biosystems) y sintetizados por Invitrogen. La eficiencia de amplificación, especificidad de los primers y cantidad de cDNA por muestra fue testada por el método de la curva estándar. La expresión relativa de *per1* fue calculada con el método CT con corrección de eficiencia utilizando el gen de la *β-actina* de lubina como endógeno (nº de acceso: AJ493428) (Patrino et al., 2008).

## Análisis de Datos

La expresión relativa de *per1* fue analizada por ANOVA, seguido del test de Tukey's (post-hoc) utilizando el programa SPSS. El análisis de los ritmos de expresión en cerebro, hígado y corazón fue realizado con el método de Cosinor (Nelson et al., 1979), el cual evalúa si los datos muestran una fluctuación regular sobre un periodo de 24 horas mediante el ajuste a la función coseno por el método de los mínimos cuadrados. Se consideró que el ritmo era significativo cuando  $p < 0.05$ . La acrofase (pico de expresión) fue expresada en tiempo zeitgeber (encendido de las luces = ZT0). El análisis de los ritmos fue realizado utilizando el programa "EL TEMPS®" (Prof. A. Díez Noguera, Universidad of Barcelona).

## RESULTADOS

### Clonación

Utilizando primers degenerados fue amplificado un fragmento de cDNA cuya secuencia mostró una alta homología con otras proteínas PER de vertebrados. Este fragmento mostró una identidad del 76% con PER1 de *Oryzias latipes* (NP\_001129992), en cuanto a la secuencia de aminoácidos, un 46% con PER1a de pez cebra (NP\_001025354), y un 56% con PER1b (NP\_997604) de pez cebra (blastx, usando la base de datos "Reference Protein"). A partir de la secuencia de este fragmento de cDNA se diseñaron primers, con el fin de extender la secuencia mediante 5'- y 3'- PCR-RACE (Amplificación rápida de los extremos de cDNA). Las secuencias obtenidas fueron ensambladas y revelaron la presencia de una región 5'- UTR de 662-bp, una región 3'-UTR de 410-bp, y un fragmento de lectura abierta (ORF) de 4311-bp. Este último codificaba para una proteína de 1436 aminoácidos con una masa molecular calculada de 153.6 kDa. El análisis de los dominios estructurales y el alineamiento con otras proteínas PER1 (de *Homo sapiens*, *Oryzias latipes* y *Danio rerio*) reveló que la proteína PER1 clonada contenía las mismas regiones conservadas que habían sido previamente identificadas en otras proteínas PER de vertebrados: un dominio PER-ARNT-SIM (PAS), una señal de exportación al núcleo (NES) carboxiterminal al dominio PAS, una región corta mutable (región S/M), y un dominio de repeticiones serina/treonina-glicina (región SG). Además, la secuencia deducida de aminoácidos

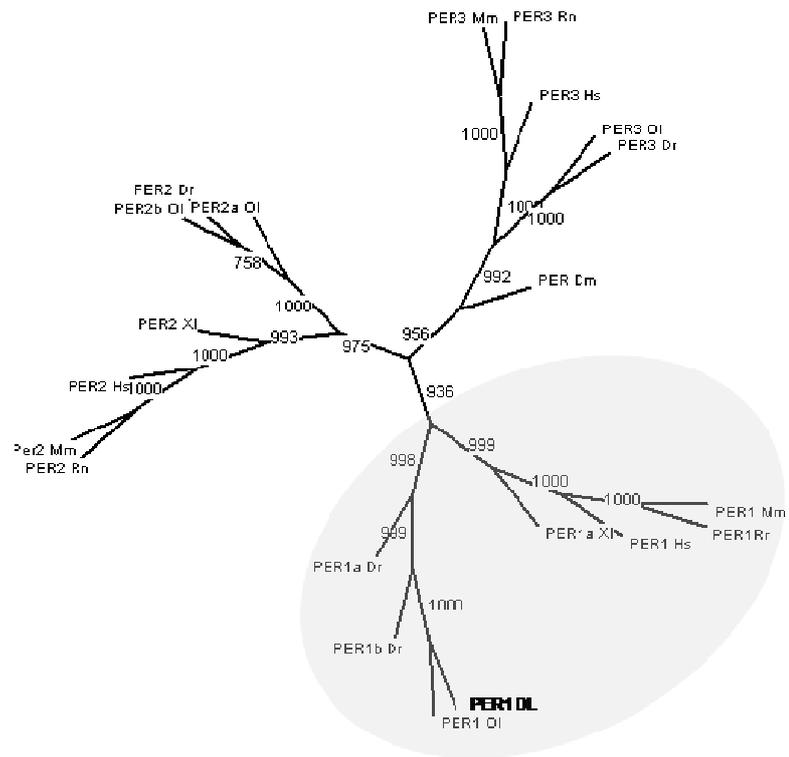


*Figura 1. Alineamiento múltiple de la secuencia deducida de aminoácidos de PER1 de lubina con otras proteínas PER de vertebrados. Los recuadros indican las regiones conservadas correspondientes al dominio PAS (regiones PAS-A, PAS-B, y PAC), un dominio mutable corto (S/M), la señal de exportación al núcleo (NES), la región de repeticiones de serina-glicina (SG), y dos sitios putativos de fosforilación por casein kinasa I (CKI). "\*" indica la presencia de residuos iguales; "." indica la presencia de sustituciones semiconservadas; ":" indica la presencia de sustituciones conservadas, Dicentrarchus labrax; Ol, Oryzias latipes; Dr, Danio rerio; Hs, Homo sapiens.*

### **Análisis filogenético**

Se realizó un análisis filogenético para caracterizar las relaciones evolutivas de proteína PER1 de lubina con otros subtipos de proteínas PER de vertebrados. El árbol consenso obtenido mostró que la proteína PER1 de lubina está estrechamente relacionada con las proteínas PER1 de teleosteos. Los diferentes subtipos de PER fueron agrupados en tres clusters con una divergencia independiente (PER1, PER2, and PER3). El subtipo PER1 fue dividido en dos sub-clusters: uno de los cuales contenía las proteínas PER1 de mamíferos y Xenopus y otro que contenía las proteínas PER1 de peces (pez cebra y Medaka). Además, la proteína PER de lubina fue agrupada en el mismo grupo que la proteína PER1 de Medaka y que las proteínas PER1a y PER1b de pez cebra (Fig. 2).

*Figura 2. Análisis filogenético que muestra las relaciones evolutivas entre la proteína PER1 de lubina y otras proteínas PER de vertebrados (PER1, PER2, y PER3). El árbol filogenético fue creado por el método de los vecinos cercanos utilizando el paquete PHYLIP (versión 3.68). Los números indican los porcentajes del remuestreo utilizando 1000 réplicas. La proteína PER de Drosophila fue usada como grupo externo. Dm, Drosophila melanogaster; Dr, Danio rerio; Ol, Oryzias latipes; Mm, Mus musculus; Rn, Rattus norvegicus; Hs, Homo sapiens; Xl, Xenopus laevis; Dl, Dicentrarchus labrax. Los números de acceso o IDs de las proteínas en RefSeq o en Ensembl aparecen en la sección Material y Métodos de este trabajo.*



**Especificidad de tejido y ritmos de expresión diaria.**

El análisis de la expresión en cerebro, corazón, hígado, agallas, musculo, tracto digestivo, tejido adiposo, bazo y retina mostró que *per1* es expresado todos los tejidos que fueron analizados (Fig. 3).

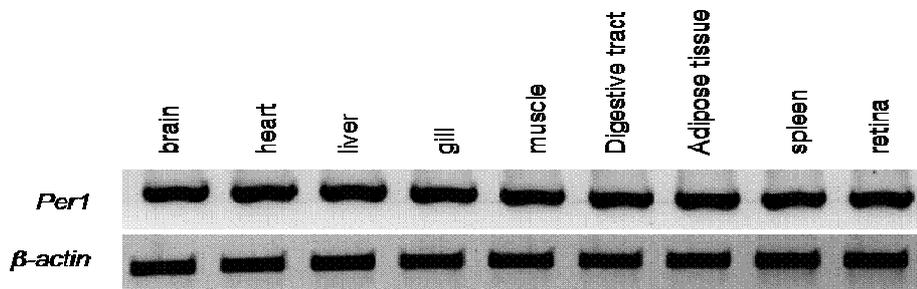


Figura 3. Expresión de *per1* en varios tejidos de lubina. Un screening por PCR fue realizado en cerebro, corazón, hígado, agallas, musculo, tracto digestivo, tejido adiposo, bazo y retina. Las muestras fueron tomadas a ZT0.

La expresión relativa de *per1* durante un día completo, fue medida en cerebro, hígado y corazón, mostrando un patrón similar en los tres tejidos. Los niveles de expresión fueron mayores al final de la fase de oscuridad, disminuyendo durante la fase de luz (Fig. 4, 5, 6). Mediante ANOVA se encontraron variaciones significativas en función del tiempo ( $p < 0.05$ ), tanto en cerebro, hígado como en corazón. El análisis de Cosinor reveló que el patrón de expresión en los tres tejidos mostraba un ritmo circadiano estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ). La acrofase, o pico de expresión, para la expresión de *per1* fue localizada a ZT23.1 ( $\pm 1.8$ ) en cerebro (Fig. 3), ZT 22.8 ( $\pm 2.0$ ) en corazón (Fig. 4), y ZT 20.9 ( $\pm 1.5$ ) en hígado, es decir próximas al final de la fase de oscuridad (Fig. 5).

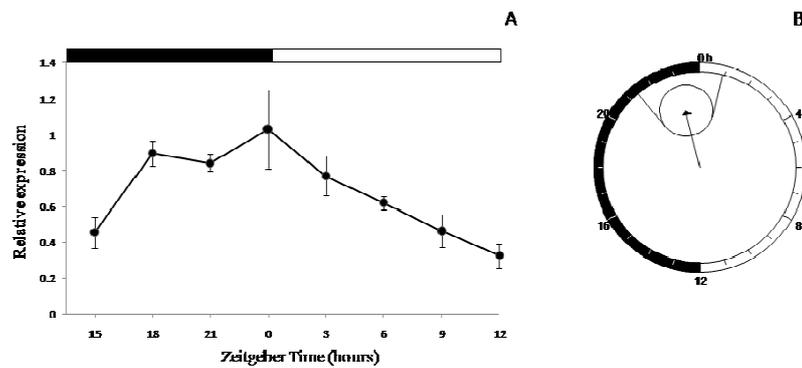


Figura 4. Expresión relativa del gen *per1* de lubina en cerebro bajo un ciclo LD (A). Los datos representan la media  $\pm$  S.E.M. de 5 cerebros diferentes. Se encontraron variaciones significativas dependiendo del tiempo (ANOVA,  $p < 0.05$ ). Las muestras de cerebro fueron tomadas cada 3 horas y la expresión relativa fue normalizada utilizando el gen de la  $\beta$ -actina como gen endógeno. Análisis de cosinor de la expresión de *per1* en cerebro (B). Este análisis mostró la existencia de un ritmo circadiano de expresión significativo ( $p < 0.05$ ). La flecha indica la acrofase del ritmo. Las dos barras adyacentes a la elipse indican el límite de confianza de la acrofase al 95%.

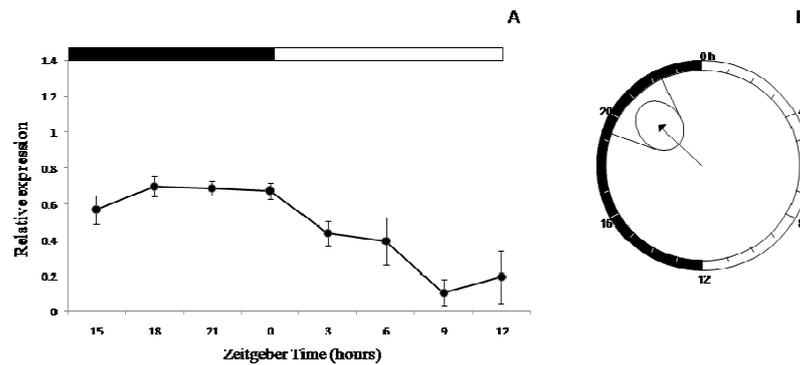


Figura 5. Expresión relativa del gen *per1* de lubina en hígado bajo un ciclo LD (A). Los datos representan la media  $\pm$  S.E.M. de 5 muestras de hígado diferentes. Se encontraron variaciones significativas dependiendo del tiempo (ANOVA,  $p < 0.05$ ). Las muestras de cerebro fueron tomadas cada 3 horas y la expresión relativa fue normalizada utilizando el gen de la  $\beta$ -actina como gen endógeno. Cosinor de la expresión de *per1* en cerebro (B). Este análisis mostró la existencia de un ritmo circadiano de expresión significativo ( $p < 0.05$ ). La flecha indica la acrofase del ritmo y las dos barras adyacentes a la elipse indican el límite de confianza de la acrofase al 95%.

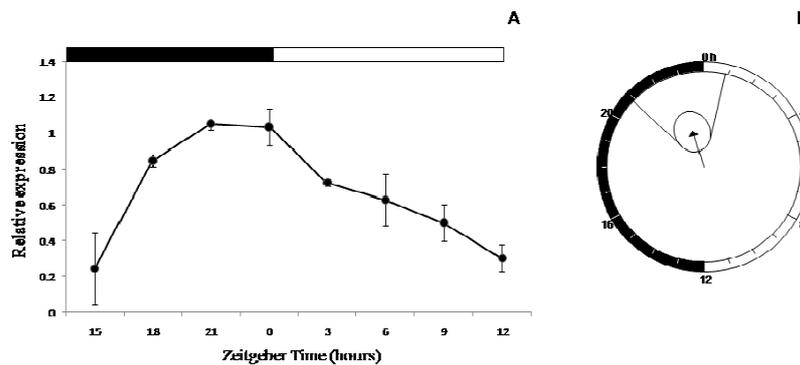


Figura 6. Expresión relativa de *per1* de lubina en corazón bajo un ciclo LD (A). Los datos representan la media  $\pm$  S.E.M. de 5 muestras de corazón diferentes. Se encontraron variaciones significativas dependiendo del tiempo (ANOVA,  $p < 0.05$ ). Las muestras de cerebro fueron tomadas cada 3 horas y la expresión relativa fue normalizada utilizando el gen de la  $\beta$ -actina como gen endógeno. Cosinor de la expresión de *per1* en cerebro (B). Este análisis mostró la existencia de un ritmo circadiano de expresión significativo ( $p < 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

En el presente estudio, se clonó el gen *per1* de lubina completo. El análisis de su secuencia reveló la existencia de un ORF que codificaba para una proteína de 1436 aminoácidos con una

alta homología con otras proteínas PER de vertebrados, mostrando la mayor identidad con la proteína PER1 de *Oryzias latipes*. El análisis filogenético reveló las relaciones evolutivas de la proteína PER de lubina con los diferentes subtipos de proteínas PERs de vertebrados. En contraste con *Drosophila*, que tiene un solo gen PER, los vertebrados tetrápodos (incluyendo el hombre) tienen tres genes parálogos para este gen (*per1*, *per2*, y *per3*). Estos genes fueron generados, probablemente, por dos rondas de duplicaciones genómicas que ocurrieron en la evolución de los cordados (Schantz et al., 2006; Wang 2008). Adicionalmente, los teleósteos presentan copias extra de estos genes *per*, que fueron generadas a partir de una nueva duplicación genómica, la cual tuvo lugar, probablemente, en teleósteos ancestrales. (Amores et al., 1998; Postlethwait et al., 1998; Meyer & Schartl 1999; Aparicio et al. 2002; Christoffels et al., 2004; Meyer & Van, 2005; Woods et al., 2005; Wang, 2008). Así pues, en el pez cebra se han conservado dos genes de *per1* llamados *per1a* y *per1b*, mientras que otros peces, como medaka, fugu, *Tetraodon nigroviridis*, y *Gasterosteus aculeatus*, han retenido solo una copia de *per1*, la cual presenta una mayor similitud con el gen *per1b* de pez cebra (Wang, 2008). En el árbol consenso, el gen clonado en el presente estudio, es agrupado junto a los genes *per1b* de pez cebra y *per1* de medaka (*O. latipes*). Estos resultados concuerdan con la evolución de estas especies ya que la lubina está más cercana evolutivamente a medaka, fugu y tetraodon. Además, es posible que el gen clonado en este estudio sea la única copia del gen *per1* presente en lubina, como ocurre en medaka. Sin embargo, se necesitan más estudios para confirmar si existen otros homólogos de este gen similares a los del pez cebra, tanto en lubina como en medaka, fugu y tetraodon.

Las regiones conservadas descritas en otras proteínas PERs de vertebrados y de *Drosophila*, también fueron identificadas en la secuencia de aminoácidos deducida de la proteína PER1 de lubina. El dominio estructural más importante caracterizado en proteínas PER, y presente en la proteína PER1 de lubina, es el dominio PAS. Este dominio fue aislado por primera vez en la proteína PER de *Drosophila*, en la proteína ARNT (the Ah receptor nuclear translocator) y en la proteína SIM (*Drosophila* single minded) de *Drosophila*, pero aparece también, en otras muchas proteínas de señalización, donde el dominio PAS participa en la dimerización con otras proteínas PAS, actuando como la “superficie” donde tienen lugar interacciones con otros dominios PAS (Gu et al., 2000). En las proteínas PER, este dominio está implicado en la dimerización con otras proteínas reloj que tienen también este dominio. La

región PAS consiste en 250-300 aminoácidos, en los cuales existen dos subdominios que consisten repeticiones adyacentes de 50 aminoácidos llamados repeticiones PAS-A y PAS-B. El dominio PAS aparece frecuentemente asociado con el motivo PAC (*PAS-associated C-terminal motif*), una región conservada de 40-45 aminoácidos carboxiterminal a la región PAS en muchas proteínas. Recientemente, ésta ha sido descrita como un dominio estructural directamente unido al dominio PAS y que contribuye a mantener a su estructura, de manera que el conjunto se ha denominado plegamiento PAS. Así pues, el plegamiento PAS que aparece en las proteínas PER, incluyendo la proteína PER1 de lubina y se corresponde a un dominio estructural previamente definido como dos dominios PAS y PAC (Hefti et al., 2004).

Otros dominios estructurales y funcionales caracterizados en proteínas PER fueron también identificados en la proteína PER1 de lubina: una señal de exportación al núcleo (NES) carboxiterminal al plegamiento PAS e implicada en la translocación al núcleo (Vielhaber et al., 2001), una región S/M (short-mutable domain) y una región de repeticiones serina/treonina-glicina (SG) (Tei et al., 1997; Young, 1998). Además, fueron identificados varios sitios putativos de fosforilación por Casein kinasa I (CKI). Recientemente, ha sido descrito que las proteínas PER y otras proteínas reloj son reguladas por fosforilación por CKI (isoformas *epsilon* y *delta*) (Agostino et al., 2008). Además, la fosforilación de PER por CKI $\epsilon$  ha sido relacionada con la regulación de la localización celular, y con la estabilidad y degradación de esta proteína por la vía del proteosoma. Más específicamente, las regiones conservadas identificadas en la proteína PER1 de lubina han sido descritas previamente como esenciales en proteínas relacionadas, por ejemplo, para la translocación al núcleo de mPER1 en ratón (Takano et al., 2004), y también implicadas las alteraciones de PER2 que provocan el síndrome FASPAS (síndrome familiar de la fase del sueño avanzado, del inglés: *familial advanced sleep phase syndrome*) en humanos (Toh et al., 2001).

Así pues, basándonos en las evidencias estructurales y en los análisis filogenéticos, podemos concluir que la proteína identificada en este estudio, pertenece a la familia de proteínas PER, estando estrechamente relacionada con las proteínas PER1 de *Oryzias* y PER1b de pez cebra, las cuales también presentan un alto grado de homología entre ellas (Vallone et al., 2004; Park et al., 2007).

El screening por PCR mostro que *perl* expresado ubicuamente en lubina. El mRNA de *perl* fue detectado en todos los tejidos analizados (cerebro, corazón, hígado, agallas, musculo tracto digestivo, tejido adiposo, bazo y retina). Estos resultados no son sorprendentes, ya que en los últimos años se ha descrito la expresión de los genes reloj en muchos tejidos periféricos, tanto en mamíferos como en peces, demostrándose que estos genes no solo son expresados en cerebro (Whitmore et al., 1998; Yoo et al., 2004).

El patrón diario de expresión de *perl* en lubina, fue analizado en tejidos neurales (cerebro) y periféricos (hígado y corazón). En los tres tejidos se encontraron patrones similares de expresión con una acrofase, o pico de expresión, cercano al encendido de las luces (ZT0). Este patrón es similar a los descritos previamente para *perl* en líneas celulares de pez cebra (PAC-2), en larvas de pez cebra (Lahiri et al., 2005), en carpines adultos (Velarde et al, 2009), y en peces cebra adultos (Sánchez & Sánchez-Vázquez, 2009). Por otro lado, estos patrones de expresión fueron obtenidos bajo condiciones de temperatura y fotoperiodo similares a los utilizados en estudios previos, realizados con lubina (12L:12D, 20°C), que muestran que esta especie puede presentar tanto un comportamiento diurno, como nocturno (Sánchez-Vázquez et al., 1995, 1997).

En conclusión, en este estudio se ha clonado el gen *perl* de lubina, el cual fue expresado en todos los tejidos analizados. Además, la expresión de este gen, en lubinas sometidas a un ciclo LD, mostró un ritmo circadiano significativo tanto en tejidos nerviosos como en tejidos periféricos, mostrando un pico de expresión cercano a ZT0. La identificación y caracterización de este gen proporciona una valiosa información para la elucidación de los mecanismos moleculares implicados la regulación del sistema circadiano de esta especie. Futuros estudios podrán determinar el papel de *perl* en el sistema circadiano de esta especie, así como en las inversiones de comportamiento y en la ontogenia de los relojes moleculares de la lubina.

### **Agradecimientos.**

Este estudio ha sido financiado por el proyecto “Aquagenomics” (28502) del Ministerio de Ciencia y Tecnología de España (MCIN) concedido a FJSV y por la ayuda predoctoral concedida a JASF por el MICINN.

## REFERENCIAS

Agostino PV, Plano SA, Golombek DA. (2008) .Circadian and pharmacological regulation of casein kinase I in the hamster suprachiasmatic nucleus. *J. Genet.* 87: 467-471.

Albrecht U, Sun ZS, Eichele G, Lee CC. (1997). A differential response of two putative mammalian circadian regulators, *mper1* and *mper2*, to light. *Cell* 91: 1055-1064.

Albrecht U, Zheng B, Larkin D, Sun ZS, Lee CC. (2001). *mPer1* and *mper2* are essential for normal resetting of the circadian clock. *J. Biol. Rhythms* 16: 100-104.

Amores A, Force A, Yan YL, Joly L, Amemiya C, Fritz A, Ho RK, Langeland J, Prince V, Wang YL, Westerfield M, Ekker M, Postlethwait JH. (1998). Zebrafish *hox* clusters and vertebrate genome evolution. *Science* 282: 1711-1714.

Aparicio S, Chapman J, Stupka E, Putnam N, Chia JM, Dehal P, Christoffels A, Rash S, Hoon S, Smit A, Gelpke MD, Roach J, Oh T, Ho IY, Wong M, Detter C, Verhoef F, Predki P, Tay A, Lucas S, Richardson P, Smith SF, Clark MS, Edwards YJ, Doggett N, Zharkikh A, Tavtigian SV, Pruss D, Barnstead M, Evans C, Baden H, Powell J, Glusman G, Rowen L, Hood L, Tan YH, Elgar G, Hawkins T, Venkatesh B, Rokhsar D, Brenner S. (2002). Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. *Science* 297:1301–1310.

Bae K, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM, Weaver DR. (2001). Differential functions of *mPer1*, *mPer2*, and *mPer3* in the SCN circadian clock. *Neuron* 30: 525-536.

Bargiello TA, Jackson FR, Young MW. (1984). Restoration of circadian behavioural rhythms by gene transfer in *Drosophila*. *Nature* 312:752-754.

Bayarri MJ, Madrid JA, Sanchez-Vazquez FJ. (2002). Influence of light intensity, spectrum and orientation on sea bass plasma and ocular melatonin. *J. Pineal Res.* 32: 34-40.

Baylies MK, Voshall LB, Sehgal A, Young MW. (1992). New short period mutations of the *Drosophila* clock gene *per*. *Neuron* 9: 575-581.

Bell-Pedersen D, Cassone VM, Earnest DJ, Golden SS, Hardin PE, Thomas TL, Zoran MJ. (2005). Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat. Rev. Genet.* 6: 544-556.

Cahill GM. (2002). Clock mechanisms in zebrafish. *Cell Tissue Res.* 309: 27-34.

Cermakian N, Whitmore D, Foulkes NS, Sassone-Corsi P. (2000). Asynchronous oscillations of two zebrafish CLOCK partners reveal differential clock control and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 4339-4344.

Christoffels A, Koh EG, Chia JM, Brenner S, Aparicio S, Venkatesh B. (2004). Fugu genome analysis provides evidence for a whole-genome duplication early during the evolution of ray-finned fishes. *Mol. Biol. Evol.* 21: 1146-1151.

Dardente H, Cermakian N. (2007). Molecular circadian rhythms in central and peripheral clocks in mammals. *Chronobiol. Int.* 24: 195-213.

Delaunay F, Thisse C, Marchand O, Laudet V, Thisse B. (2000). An inherited functional circadian clock in zebrafish embryos. *Science* 289: 297-300.

Delaunay F, Thisse C, Thisse B, Laudet V. (2003). Differential regulation of Period 2 and Period 3 expression during development of the zebrafish circadian clock. *Gene Expr. Patterns* 3: 319-324.

Dunlap JC. (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 96: 271-290.

Felsenstein. (1989). PHYLIP—Phylogeny Inference Package (version 32). *Cladistics* 5: 164-166.

Garcia-Allegue R, Madrid JA, Sanchez-Vazquez FJ. (2001). Melatonin rhythms in European sea bass plasma and eye influence of seasonal photoperiod and water temperature. *J. Pineal Res.* 31: 68-75.

Grima B, Chelot E, Xia R, Rouyer F. (2004). Morning and evening peaks of activity rely on different clock neurons of the *Drosophila* brain. *Nature* 431: 869-873

Gu YZ, Hogenesch JB, Bradfield CA. (2000). The PAS superfamily sensors of environmental and developmental signals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40: 519-561.

Hefti MH, Francoijs KJ, de Vries SC, Dixon R, Vervoort J. (2004). The PAS fold A redefinition of the PAS domain based upon structural prediction. *Eur. J. Biochem.*, 271: 1198-1208.

Huang ZJ, Curtin KD, Rosbash M. (1995). PER protein interactions and temperature compensation of a circadian clock in *Drosophila*. *Science* 267: 1169-1172.

Kewley RJ, Whitelaw ML, Chapman-Smith A. (2004). The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36: 189-204.

Ko CH, Takahashi JS. (2006). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum. Mol. Genet.* 15: R271-R277.

Kobayashi Y, Ishikawa T, Hirayama J, Daiyasu H, Kanai S, Toh H, Fukuda I, Tsujimura T, Terada N, Kamei Y, Yuba S, Iwai S, Todo T. (2000). Molecular analysis of zebrafish photolyase/cryptochrome family two types of cryptochromes present in zebrafish. *Genes Cells* 5: 725-738.

Konopka RJ, Benzer S. (1971). Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68: 2112-2116.

Lahiri K, Vallone D, Gondi SB, Santoriello C, Dickmeis T, Foulkes NS. (2005). Temperature regulates transcription in the zebrafish circadian clock. *PLoS Biol.* 3:e351.

Letunic I, Copley RP, Pils B, Pinkert S, Schultz J, Bork P. (2006). SMART 5: domains in the context of genomes and networks. *Nucleic Acids Res.* 34: 257–260.

Ligo M, Sanchez-Vazquez FJ, Madrid JA, Zamora S, Tabata M. (1997). Unusual responses to light and darkness of ocular melatonin in European sea bass. *Neuroreport* 8:1631-1635.

Meyer A, Schartl M. (1999). Gene and genome duplications in vertebrates the one-to-four (-to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11: 699-704.

Meyer A, Van de PY. (2005). From 2R to 3R evidence for a fish-specific genome duplication (FSGD). *Bioessays* 27: 937-945.

Nelson W, Tong YL, Lee JK, Halberg F. (1979). Methods for cosinor-rhythmometry. *Chronobiologia* 6: 305-323.

Numano R, Yamazaki S, Umeda N, Samura T, Sujino M, Takahashi R, Ueda M, Mori A, Yamada K, Sakaki Y, Inouye ST, Menaker M, Tei H. (2006). Constitutive expression of the *Period1* gene impairs behavioral and molecular circadian rhythms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 3716-3721.

Panda S, Hogenesch JB, Kay SA. (2002). Circadian rhythms from flies to human. *Nature* 417: 329-335.

Pando MP, Pinchak AB, Cermakian N, Sassone-Corsi P. (2001). A cell-based system that recapitulates the dynamic light-dependent regulation of the vertebrate-clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 10178-10183.

Pando MP, Sassone-Corsi P. (2002). Unraveling the mechanisms of the vertebrate circadian clock zebrafish may light the way. *Bioessays* 24: 419-426.

Pando MP, Morse D, Cermakian N, Sassone-Corsi P. (2002). Phenotypic rescue of a peripheral clock genetic defect via SCN hierarchical dominance. *Cell* 110: 107-117.

Park JG, Park YJ, Sugama N, Kim SJ, Takemura A. (2007). Molecular cloning and daily variations of the *Period* gene in a reef fish *Siganus guttatus*. *J. Comp. Physiol. A* . 193: 403-411.

Patruno M, Sivieri S, Poltronieri C, Sacchetto R, Maccatrozzo L, Martinello T, Funkenstein B, Radaelli G. (2008). Real-time polymerase chain reaction, in situ hybridization and immunohistochemical localization of insulin-like growth factor-I and myostatin during development of *Dicentrarchus labrax* (Pisces Osteichthyes). *Cell Tissue Res.* 331: 643-658.

Portaluppi F, Touitou Y, Smolensky MH. (2008). Ethical and methodological standards for laboratory and medical biological rhythm research. *Chronobiol. Int.* 25: 999-1016.

Postlethwait JH, Yan YL, Gates MA, Horne S, Amores A, Brownlie A, Donovan A, Egan ES, Force A, Gong Z, Goutel C, Fritz A, Kelsh R, Knapik E, Liao E, Paw,B, Ransom D,

Singer A, Thomson M, Abduljabbar TS, Yelick P, Beier D, Joly JS, Larhammar D, Rosa F, Westerfield M, Zon LI, Johnson SL, Talbot WS. (1998). Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map. *Nat. Genet.* 18: 345-349.

Reddy P, Zehring WA, Wheeler DA, Pirrotta V, Hadfield C, Hall JC, Rosbash M. (1984). Molecular analysis of the period locus in *Drosophila melanogaster* and identification of a transcript involved in biological rhythms. *Cell* 38: 701-710.

Sanchez JA, Sanchez-Vazquez FJ. (2009). Feeding entrainment of daily rhythms of locomotor activity and clock gene expression in zebrafish brain. *Chronobiol. Int.* 26: 1120-1135.

Sanchez-Vazquez FJ, Madrid JA, Zamora S. (1995). Circadian rhythms of feeding activity in sea bass, *Dicentrarchus labrax* L dual phasing capacity of diel demand-feeding pattern. *J. Biol. Rhythms* 10: 256-266.

Sanchez-Vazquez FJ, Iigo M, Madrid JA, Zamora S, Tabata, M. (1997). Daily cycles of plasma and ocular melatonin in demand-fed sea Bass, *Dicentrarchus labrax* L. *J. Comp. Physiol. (B)* 167: 409-415.

Sanchez-Vazquez FJ, Azzaydi M, Martinez FJ, Zamora S, Madrid JA. (1998). Annual rhythms of demand-feeding activity in sea bass evidence of a seasonal phase inversion of the diel feeding pattern. *Chronobiol. Int.* 15: 607-622.

Schantz M von, Jenkins A, Archer SN. (2006). Evolutionary history of the vertebrate period genes. *J. Mol. Evol.* 62:701-707.

Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP. (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:5857-5864.

Shearman LP, Zylka MJ, Weaver DR, Kolakowski LF Jr, Reppert SM. (1997). Two period homologs circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron* 19: 1261-1269.

Sun ZS, Albrecht U, Zhuchenko O, Bailey J, Eichele G, Lee CC. (1997). RIGUI, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila* period gene. *Cell* 90: 1003-1011.

Takano A, Isojima Y, Nagai K. (2004). Identification of mPer1 phosphorylation sites responsible for the nuclear entry. *J. Biol. Chem.* 279: 32578-32585.

Tamai TK, Carr AJ, Whitmore D. (2005). Zebrafish circadian clocks cells that see light. *Biochem. Soc. Trans.* 33: 962-966.

Tauber E, Last KS, Olive PJ, Kyriacou CP. (2004). Clock gene evolution and functional divergence. *J. Biol. Rhythms* 19: 445-458.

Tei H, Okamura H, Shigeyoshi Y, Fukuhara C, Ozawa R, Hirose M, Sakaki Y. (1997). Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila* period gene. *Nature* 389: 512-516.

Toh KL, Jones CR, He Y, Eide EJ, Hinze WA, Virshup DM, Ptacek LJ, Fu YH. (2001). An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science* 291: 1040-1043.

Vallone D, Gondi SB, Whitmore D, Foulkes NS. (2004). E-box function in a period gene repressed by light. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 4106-4111.

Velarde E, Haque R, Iuvone PM, Azpeleta C,onso-Gomez AL, Delgado MJ. (2009). Circadian clock genes of goldfish, *Carassius auratus* cDNA cloning and rhythmic expression of period and cryptochrome transcripts in retina, liver, and gut. *J. Biol. Rhythms* 24: 104-113.

Vielhaber EL, Duricka D, Ullman KS, Virshup DM. (2001). Nuclear export of mammalian PERIOD proteins. *J. Biol. Chem.* 276: 45921-45927.

Wang H. (2008). Comparative analysis of period genes in teleost fish genomes. *J. Mol. Evol.* 67: 29-40.

Whitmore D, Foulkes NS, Strahle U, Sassone-Corsi P. (1998). Zebrafish Clock rhythmic expression reveals independent peripheral circadian oscillators. *Nat. Neurosci.* 1: 701-707.

Woods IG, Wilson C, Friedlander B, Chang P, Reyes DK, Nix R, Kelly PD, Chu F, Postlethwait JH, Talbot WS. (2005). The zebrafish gene map defines ancestral vertebrate chromosomes. *Genome Res.* 15: 1307-1314.

Yildiz O, Doi M, Yujnovsky I, Cardone L, Berndt A, Hennig S, Schulze S, Urbanke C, Sassone-Corsi P, Wolf E. (2005). Crystal structure and interactions of the PAS repeat region of the *Drosophila* clock protein PERIOD. *Mol. Cell* 17: 69-82.

Yoo SH, Yamazaki S, Lowrey PL, Shimomura K, Ko CH, Buhr ED, Sieppka SM, Hong HK, Oh WJ, Yoo OJ, Menaker M, Takahashi JS. (2004). PERIOD2 LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 5339-5346.

Young MW. (1998). The molecular control of circadian behavioral rhythms and their entrainment in *Drosophila*. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 135-152.

Yu W, Hardin PE. (2006). Circadian oscillators of *Drosophila* and mammals. *J. Cell Sci.* 119: 4793-4795.

Zheng B, Albrecht U, Kaasik K, Sage M, Lu W, Vaishnav S, Li Q, Sun ZS, Eichele G, Bradley A, Lee CC. (2001). Nonredundant roles of the *mPer1* and *mPer2* genes in the mammalian circadian clock. *Cell* 105: 683-694.

Ziv L, Gothilf Y. (2006). Circadian time-keeping during early stages of development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 4146-4151.





## 2. ONTOGENIA DEL RELOJ CIRCADIANO EN LARVAS DE LUBINA.

Sanchez JA, Villamizar N, Blanco-Vives B, Sanchez-Vazquez FJ.

### RESUMEN.

En teleósteos, la maduración de los relojes moleculares comienza muy pronto en el desarrollo embrionario y el fotoperiodo juega un importante papel en el inicio o sincronización de los ritmos circadianos tanto a nivel molecular, como fisiológico y comportamental. En este trabajo, se investigó el efecto del fotoperiodo y de la longitud de onda del espectro lumínico sobre la expresión del gen *per1*, durante el desarrollo de larvas de lubina. Después de la fecundación, los embriones fueron expuestos a diferentes condiciones lumínicas, luz constante (LL), oscuridad constantes (DD) y bajo un fotoperiodo 12L:12D utilizando luz con diferente composición espectral o longitud de onda: luz blanca (LDW), roja (LDR) y azul (LDB). A partir de la eclosión, se tomaron muestras aproximadamente cada 3 horas hasta el día 5 post-eclosión y también a lo largo del día 16. La expresión del gen *per1*, en las larvas de los grupos experimentales LDW y LDB mostró un ritmo circadiano de expresión de este gen en el día 16 post-eclosión. Además, en el día 5, se detectó un ritmo de baja amplitud en el grupo LDB. Sin embargo, en ausencia de un fotoperiodo (luz u oscuridad constantes) el gen *per1* fue expresado de forma arrítmica durante los primeros 16 días post-eclosión. Por último, el fotoperiodo de luz roja no fue capaz de sincronizar o iniciar la expresión rítmica de este gen. Estos resultados muestran la importancia de las condiciones lumínicas (fotoperiodo y longitud de onda) para el inicio de expresión rítmica de los genes reloj durante el desarrollo de la lubina.

**Keywords:** Lubina, relojes moleculares, *per1*, ontogenia sistema circadiano.



## INTRODUCCIÓN.

El desarrollo de los relojes moleculares es un paso previo y necesario para la maduración o desarrollo del sistema circadiano. En teleósteos, diversos procesos, tales como la organogénesis, eclosión, metamorfosis, crecimiento, etc., siguen un estricto orden temporal, por lo que la existencia de mecanismos de medida del tiempo podría jugar un importante papel regulador de estos procesos. Sin embargo, el papel de los relojes biológicos en el desarrollo embrionario de teleósteos, es poco conocido. Hasta la fecha, los estudios sobre ontogenia de los relojes moleculares en teleósteos se han llevado a cabo casi exclusivamente en el pez cebra. En esta especie, se ha demostrado la existencia de relojes moleculares funcionales desde estadios tempranos del desarrollo, cuyo desarrollo se ve afectado la luz o fotoperiodo. Además, el fotoperiodo juega un importante papel en el inicio y/o sincronización de los ritmos circadianos no solo a nivel molecular, sino también a nivel fisiológico y comportamental (Hurd y Cahill, 2002; Cahill, 2002; Kaneko y Cahill, 2005; Ziv y Gothilf, 2006).

Paralelamente, la luz y el fotoperiodo tienen un profundo impacto sobre la supervivencia y crecimiento de lavas de teleósteos (Puvanendran and Brown, 2002; Monk et al., 2006; Yoseda et al., 2008; Villamizar et al., 2009). Además, algunos estudios, han demostrado que la composición espectral de la luz también afecta al correcto desarrollo y crecimiento de larvas de teleósteos (Villamizar et al., 2009). Por otro lado, el efecto de la luz sobre los ritmos circadianos, varía en función de la longitud de onda utilizada, de manera que no todas las longitudes de onda del espectro luminoso, son igualmente eficaces en la sincronización de los ritmos circadianos (Bayarri et al., 2002). Sin embargo, a pesar de estas evidencias, se desconoce el efecto de la composición espectral de la luz sobre el desarrollo embrionario y la ontogenia de los relojes moleculares en teleósteos.

La lubina es una de las especies más importantes en la acuicultura Mediterránea, cuyo sistema circadiano ha sido muy estudiado. Esta especie presenta un comportamiento dual (Sánchez-Vázquez et al. 1995; Sánchez-Vázquez et al., 1998), pudiendo comportarse como nocturna o como diurna, lo que la hace muy atractiva desde el punto de vista de la cronobiología. Utilizando comederos a demanda, se han descrito inversiones de comportamiento bajo condiciones naturales, asociadas a cambios estacionales, así como bajo condiciones constantes de luz y temperatura (Sánchez-Vázquez et al., 1995; Sánchez-Vázquez

et al., 1998). Por otro lado, los ritmos diarios de melatonina en plasma y en retina, descritos en esta especie (Sánchez-Vázquez et al., 1997; Ligo et al., 1997; García-Allegue et al., 2001), son claramente influenciados por las condiciones lumínicas y por la temperatura del agua (Bayarri et al., 2002). Además, recientemente se ha caracterizado el gen *per1* de lubina (Sánchez y Sánchez-Vázquez, 2010), mostrando un ritmo de expresión circadiano con una acrofase situada próxima al final de la noche. Por todo lo anterior, la lubina es una especie muy atractiva para el estudio comparado de la ontogenia de los relojes moleculares en teleósteos.

El objetivo de este trabajo fue el estudio de la ontogenia de los relojes moleculares de lubina, investigando el efecto del fotoperiodo y de las diferentes longitudes de onda del espectro lumínico, sobre la expresión del gen reloj *per1*, durante el desarrollo larvario.

## **MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **Mantenimiento y Diseño experimental.**

Para este experimento se utilizaron huevos fecundados de lubina (posteriormente larvas), que fueron transferidos a tanques de unos 500 litros bajo aireación, en el Instituto Oceanográfico de Mazarrón (Murcia, España). A partir del día 8 post-eclosión, las larvas fueron alimentadas con rotíferos cultivados y alimento comercial a base de algas verdes (Phytobloom, Prof Necton, Portugal). Después de la fertilización, los huevos fueron sometidos a 5 diferentes regímenes luminosos, con tres replicas. Tres tanques fueron sometidos a un fotoperiodo 12L:12D con luz blanca (LDW, longitud de onda: 367-1057 nm), otros tres con luz roja (LDR, longitud de onda: 641-718 nm) y otros tres con luz azul (LDB, longitud de onda: 435-500 nm). Por último, tres tanques fueron mantenidos en oscuridad constante (DD) y otros tres en condiciones de luz constante (LL). Para la iluminación se utilizaron LEDs dispuestos en un placa y colocados a aproximadamente 50 cm de la superficie del agua. A partir de la eclosión se tomaron muestras aproximadamente cada 3 horas durante los primeros cinco días post-eclosión. El 16 post-eclosión, también se tomaron muestras cada 3 horas, a lo largo de 24 horas. Cada muestra consistió en un pool de aproximadamente 30 larvas, tomadas de diferentes replicas, que

fueron congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  en TRIzol® (Invitrogen, España) hasta su análisis por PCR en tiempo real. El muestreo fue hecho en las mismas condiciones lumínicas de cada tratamiento.

### **PCR en tiempo real.**

Las muestras fueron homogeneizadas en TRIzol® usando un homogeneizador (Polytron®, PT1200, Kinematica, Switzerland) y procesadas utilizando el kit PureLink Micro-to-Midi (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Una vez extraído el RNA, se cuantificó por espectrofotometría y se utilizó 1  $\mu\text{g}$  para la síntesis de cDNA, tratándolo previamente con DNasa I (1 unit/ $\mu\text{g}$  RNA, Invitrogen). La síntesis de cDNA fue llevada a cabo con Superscript III Transcriptasa Reversa, utilizando Oligo-dT (Invitrogen) como cebador. El ensayo de PCR en tiempo real fue realizado con la metodología del SYBR-Green, utilizando SYBR-Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) y ABI Prism 7500 (Applied Biosystems). El software fue programado con el siguiente protocolo:  $95^{\circ}\text{C}$  durante 10 min, seguido de 40 ciclos de  $95^{\circ}\text{C}$  durante 15 s, y  $60^{\circ}\text{C}$  durante 1 minuto. Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un volumen de 20  $\mu\text{l}$  conteniendo los primers y la Master mix de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems). Todas las muestras fueron analizadas en triplicado. La expresión relativa de *perl* fue calculada por el método CT con corrección de eficiencia normalizando la expresión con gen de la  $\beta$ -actina como endógeno (numero de acceso. AJ493428) (Patruno et al., 2008).

### **Análisis de datos**

El análisis de los ritmos de expresión relativa de *perl* fue realizado con el método de Cosinor (Nelson et al., 1979), utilizando el programa “EL TEMPS®” (Prof. A. Díez Noguera, Universidad of Barcelona). Se consideró que el ritmo era significativo cuando  $p < 0.05$ . La acrofase (pico de expresión) fue expresada en tiempo zeitgeber (encendido de las luces = ZT0).

## **RESULTADOS.**

La expresión de *perl* fue detectable desde en el primer día post-eclosión, tanto en las larvas mantenidas bajo condiciones constantes de luz y de oscuridad, como en aquellas sometidos a un fotoperiodo 12L:12D utilizando luces con diferente composición espectral.

La expresión de *per1* en larvas sometidas a condiciones constantes de luz (LL) y de oscuridad (DD), no mostró ritmos de expresión significativos en el periodo de tiempo estudiado (0-16 días post-eclosión). En cambio, las larvas sometidas a un fotoperiodo 12L:12D con luz blanca y azul (LDW y LDB) mostraron un claro ritmo de expresión de *per1* en el día 16 post-eclosión (Cosinor,  $p < 0.05$ ). En el caso del grupo LDW también se detectó un ritmo significativo en el día 5, aunque éste fue de menor amplitud ( $p < 0.05$ ) (Fig. 1).

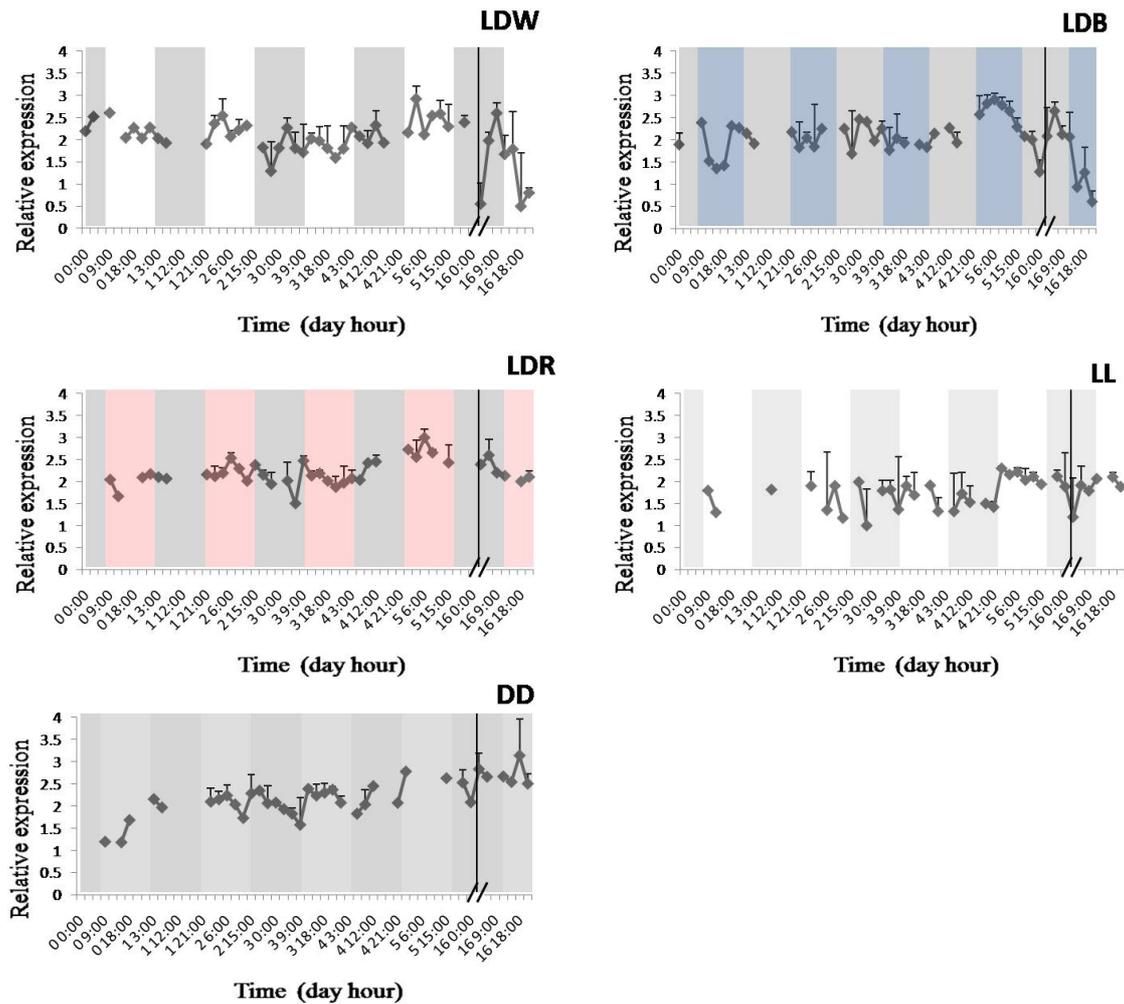


Figura 1. Expresión de *per1* en larvas de lubina en los primeros cinco días post-eclosión y en el día 16. La expresión fue determinada cada tres horas en 3 diferentes pools de unas 30 larvas sometidas a diferentes regímenes luminosos: oscuridad constante (DD), luz constante (LL) y fotoperiodos 12L:12D con luz blanca (LDW), roja (LDR) y azul (LDB).

El análisis de Cosinor mostró que la acrofase o pico de expresión del gen *per1* en el día 16 se situó a  $ZT 22.6 \pm 4.7$  en el grupo LDW, mientras que en el grupo LDB fue a  $ZT 21.1 \pm 4.2$ . En el día 5, para el grupo LDB se situó en  $ZT 21.2 \pm 2.2$  (ZT0 indica la hora de encendido de

las luces, que corresponde a las 9:00 h). En el resto de días en los diferentes tratamientos no se encontró un ritmo significativo (Cosinor,  $p > 0.05$ ) (Fig. 2).

Las larvas sometidas a un fotoperiodo LD con luz roja (LDR), tampoco se observa un claro ritmo de expresión de este gen a lo largo del periodo de estudio, similar a lo encontrado para los grupos mantenidos bajo condiciones constantes de luz y oscuridad (Fig. 1).

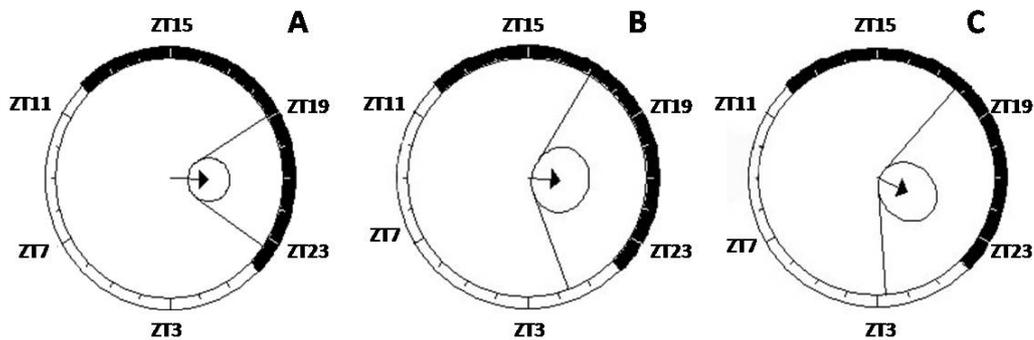


Figura 2. Análisis de cosinor de los ritmos de expresión de *per1* en larvas de lubina. Las larvas fueron sometidas a un fotoperiodo 12L:12D utilizando luz azul (A y B) y luz blanca (C). A: día 5 post eclosión, LDB. B: día 16 post-eclosión LD. C: día 16 post-eclosión, LDW.

## DISCUSIÓN.

Este artículo proporciona nuevos datos sobre la importancia del fotoperiodo en la ontogenia de los relojes moleculares de teleósteos y del sistema circadiano. Los resultados expuestos aquí, indican que las condiciones lumínicas, fotoperiodo y composición espectral, son críticas para la maduración de los relojes moleculares durante el desarrollo temprano de la lubina.

El fotoperiodo (utilizando luz blanca y azul), indujo el inicio de un ritmo circadiano en la expresión del gen reloj *per1*, a partir del día 16 post-fertilización, y en el caso de la luz azul, a partir del día 5 ya se observa un ritmo circadiano de baja amplitud. En cambio, las larvas que fueron sometidas a condiciones constantes (LL y DD) no mostraron un ritmo de expresión de *per1* durante los primeros 16 días post-eclosión. Estos resultados son similares a lo descrito en el pez cebra, donde se ha demostrado que los relojes que controlan los ritmos fisiológicos y de

comportamiento en larvas se desarrollan gradualmente y la exposición a sincronizadores es necesaria para el inicio ritmos circadianos tanto de expresión de genes reloj, como de melatonina y de comportamiento (Cahill, 2002). A nivel molecular, varios estudios demuestran que si se somete a las larvas de pez cebra a un fotoperiodo durante el primer o segundo día post-eclosión, se observa un ritmo de expresión tanto de genes reloj, como de genes clock-regulados (como *Aanat2*) en el tercer y cuarto día post-eclosión, mientras que si las larvas se desarrollan bajo oscuridad constante estos ritmos no se observan (Ziv y Gothilf 2006; Kaneko y Cahill, 2005; Dekens y Whitmore, 2008). Por ejemplo, Dekens y whitmore (2008) mostraron que la expresión rítmica de *per1* tiene lugar a partir del segundo día post-eclosión, en larvas de pez cebra bajo LD, mientras que bajo DD la expresión de este gen es constante.

En cuanto a los ritmos fisiológicos y comportamentales, también existen evidencias del efecto del fotoperiodo durante el desarrollo. Estudios previos realizados en el pez cebra muestran que la exposición al fotoperiodo inicia los ritmos circadianos de comportamiento a partir del cuarto día aproximadamente, tan pronto como las larvas comienzan a nadar y alimentarse, mientras que bajo condiciones constantes de oscuridad las larvas son arrítmicas (Cahill, 2002, Hurd y Cahill, 2002) . A nivel fisiológico, también se ha demostrado que el fotoperiodo induce la aparición de un ritmo circadiano de melatonina a partir de la segunda noche post-eclosión lo que coincide con la aparición de un ritmo en la expresión de *Aanat2*, además, ambos ritmos se mantienen cuando se transfieren las larvas a DD (Gothilf et al., 1999; Kazimi y Cahill 1999).

Por otro lado, estos resultados están correlacionados con estudios previos, que muestran que un fotoperiodo adecuado mejora el crecimiento, desarrollo y supervivencia de las larvas, mientras que las condiciones constantes de luz o de oscuridad disminuyen el crecimiento o aumentan el porcentaje de deformidades en las larvas (Barahona-Fernández, 1979; Villamizar et al., 2009).

Curiosamente, las que fueron mantenidas bajo un fotoperiodo 12L:12D con luz roja, al igual que aquellas mantenidas bajo condiciones constantes, no mostraron un ritmo de expresión claro durante los primeros 16 días post-eclosión. En adición la luz azul, fue más eficaz que la blanca, ya que los ritmos de expresión de *per1* fueron detectables en el día 5. Una posible explicación a estos resultados es que los pigmentos fotosensibles que participan en la

sincronización de los ritmos biológicos (posiblemente la pineal) sean sensibles solo a las longitudes de onda a las que están expuestas de forma natural. En este sentido, la luz azul es predominante a ciertas profundidades ya que la columna de agua actúa como un filtro cromático, de manera que la luz roja es totalmente absorbida por la columna de agua a pocos metros de la superficie, mientras que la luz azul y violeta son transmitidas a mayor profundidad (Nicol, 1989; Wolken, 1995; Villamizar et al., 2009). Además, estos resultados son apoyados por experimentos realizados por Bayarri (2002), quien demostró que los ritmos de melatonina en lubina son fuertemente afectados por la luz azul. Resultados similares han sido encontrados en la pineal de pez cebra, donde la luz roja provoca una menor supresión de la producción de melatonina, que la luz azul (Ziv et al, 2007). Por otro lado, estos resultados son paralelos a los obtenidos por Villamizar (2009), en los que un fotoperiodo de luz azul mejoró el crecimiento larvario en lubina y disminuyó el porcentaje de malformaciones, respecto de aquellas larvas mantenidas en DD y con un fotoperiodo de luz roja.

En todos los grupos experimentales, la expresión *per1* fue detectable desde el primer día post-eclosión, independientemente del fotoperiodo. Existen evidencias de la presencia de transcritos de genes reloj en las primeras horas post-eclosión en pez cebra (Dekens y Whitmore, 2008). Se ha postulado la posibilidad incluso, de una herencia materna de transcritos para genes reloj que aparecen ya en huevos sin fecundar (Delaunay, et al., 2000). Además, se han atribuido funciones, no relacionadas con sistema circadiano a estos transcritos, durante el desarrollo embrionario temprano (Vallone et al., 2007).

Se han propuesto varias hipótesis sobre el papel de la luz en el desarrollo del sistema circadiano del pez cebra. La luz podría actuar iniciando la oscilación circadiana, o bien sincronizando múltiples osciladores (Vallone et al., 2007). Nuestros resultados son compatibles con las dos hipótesis, ya que la expresión del gen *per1* fue detectable a partir del día 1 post-eclosión de forma arrítmica y la luz podría haber actuado bien iniciando la expresión rítmica, o bien sincronizando los ritmos a nivel celular en los grupos LDW y LDB. Es decir, cabe la posibilidad de que existan ritmos a nivel celular, pero asincrónicos, y el fotoperiodo actuaría sincronizando estos ritmos celulares. Los estudios realizados por Dekens y Whitmore (2008) en pez cebra apuntan hacia esta última hipótesis, ya estos autores observaron ritmos de expresión

asincrónicos de *perl* a nivel celular, en el primer día post eclosión bajo DD, que eran sincronizados al transferir las larvas a LD.

Por otro lado, como se menciona anteriormente, existe una correlación entre el efecto del fotoperiodo y espectro sobre la maduración de los ritmos circadianos y el efecto sobre la mejora del crecimiento y desarrollo en larvas. No existen evidencias claras acerca de posible papel de los relojes moleculares como reguladores del desarrollo, sin embargo los datos disponibles muestran que tanto los ritmos de expresión de genes reloj, como los ritmos manifiestos maduran muy pronto en el desarrollo de teleósteos (Hurd y Cahill, 2002; Cahill, 2002; Kanekio y Cahill, 2005; Ziv y Gothilf, 2006; Vallone et al., 2007). Es posible que los relojes biológicos actúen regulando procesos del desarrollo que deben ocurrir con un orden temporal correcto. Por otro lado, se han descrito ritmos circadianos de división celular en pez cebra (Dekens et al., 2003), que aparecen tan pronto como los relojes moleculares comienzan a funcionar (4 dpf). El restringir el momento del día en que tiene lugar la fase S de la mitosis podría ser una ventaja adaptativa, al disminuir el daño por luz UV (Vallone et al., 2007). Además, los ritmos de secreción de melatonina también han sido implicados en la estimulación de la proliferación celular en los momentos del día con menor radiación UV, en embriones de pez cebra (Danilova et al., 2004). Por último, no existen datos acerca de los efectos a largo plazo de las condiciones de desarrollo de los relojes biológicos y del sistema circadiano de teleósteos, aunque serían de interés estudios sobre su posible efecto en los plásticos y variables ritmos de comportamiento observados en la lubina, así como en las inversiones de comportamiento (Sánchez-Vázquez et al. 1995; Sánchez-Vázquez et al., 1998).

En conclusión, el fotoperiodo es un factor importante en la maduración de los relojes biológicos de larvas lubina. En ausencia de un fotoperiodo (luz u oscuridad constantes), el gen reloj *perl* es expresado de forma arrítmica, al menos durante los primeros 16 días post-eclosión, y se requiere de un fotoperiodo para iniciar los ritmos de expresión de este gen. Además, la luz roja no tiene capacidad para sincronizar o iniciar la expresión rítmica de *perl* en larvas de lubina. Estos resultados muestran la importancia de las condiciones lumínicas en la maduración normal de los relojes biológicos de lubina.

## **AGRADECIMIENTOS.**

Este trabajo ha sido realizado gracias al proyecto “Aquagenomics” (28502) del Ministerio de Ciencia y Tecnología. Queremos agradecer también el apoyo prestado al personal del Instituto Español de Oceanografía (Mazarrón, Murcia).

## **REFERENCIAS.**

Barahona-Fernandes, M.H., 1979. Some effects of light intensity and photoperiod on the sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) reared at the Centre Oceanologique de Bretagne. *Aquaculture* 17, 311–321.

Bayarri MJ, Madrid JA, Sanchez-Vazquez FJ. (2002). Influence of light intensity, spectrum and orientation on sea bass plasma and ocular melatonin. *J. Pineal Res.* 32: 34-40.

Cahill GM. (2002). Clock mechanisms in zebrafish. *Cell Tissue Res.* 309: 27-34.

Danilova N, Krupnik VE, Sugden D, Zhdanova IV. 2004. Melatonin stimulates cell proliferation in zebrafish embryo and accelerates its development. *FASEB J* 18:751–753.

Dekens MP, Santoriello C, Vallone D, Grassi G, Whitmore D, Foulkes NS. 2003. Light regulates the cell cycle in zebrafish. *Curr Biol.* 2; 13(23):2051-7.

Dekens MP, Whitmore D. 2008. Autonomous onset of the circadian clock in the zebrafish embryo. *The EMBO journal.* 27(20):2757-65.

Delaunay F, Thisse C, Marchand O, Laudet V, Thisse B. F. An Inherited Functional Circadian Clock in Zebrafish Embryos. 2000. *Science.* 289(5477):297-300.

Garcia-Allegue R, Madrid JA, Sanchez-Vazquez FJ. (2001). Melatonin rhythms in European sea bass plasma and eye influence of seasonal photoperiod and water temperature. *J. Pineal Res.* 31: 68-75.

Gothilf Y, Coon SL, Toyama R, Chitnis A, Namboodiri MA, Klein DC. 1999. Zebrafish serotonin N-acetyltransferase-2: marker for development of pineal photoreceptors and circadian clock function. *Endocrinology.* 140(10):4895-903.

Hurd MW, DeBruyne J, Straume M, Cahill GM. (1998). Circadian rhythms of locomotor activity in zebrafish. *Physiol. Behav.* 65: 465-472.

Hurd MW, Cahill GM (2002) Entraining signals initiate behavioral circadian rhythmicity in larval zebrafish. *J Biol Rhythms* 17: 307–314

Kaneko M, Cahill GM. 2005. Light-dependent development of circadian gene expression in transgenic zebrafish. *PLoS Biol.* 2005. 3(2):e34.

Kazimi N, Cahill GM 1999. Development of a circadian melatonin rhythm in embryonic zebrafish. *Brain Res Dev Brain Res.* 1999 Oct 20; 117(1):47-52.

Lahiri K, Vallone D, Gondi SB, et al. 2005. Temperature regulates transcription in the zebrafish circadian clock. *PLoS biology.* 3(11):e351.

Ligo M, Sanchez-Vazquez FJ, Madrid JA, Zamora S, Tabata M. (1997). Unusual responses to light and darkness of ocular melatonin in European sea bass. *Neuroreport* 8:1631-1635.

Monk, J., Puvanendran, V., Brown, J.A., 2006. Do different light regimes affect the foraging behaviour, growth and survival of larval cod (*Gadus morhua* L.)? *Aquaculture* 257, 87–293.

Nicol, J.A.C., 1989. The photoenvironment. *The Eyes of Fishes*. Clarendon Press, Oxford.

Patruno M, Sivieri S, Poltronieri C, Sacchetto R, Maccatrozzo L, Martinello T, Funkenstein B, Radaelli G. (2008). Real-time polymerase chain reaction, in situ hybridization and immunohistochemical localization of insulin-like growth factor-I and myostatin during development of *Dicentrarchus labrax* (Pisces Osteichthyes). *Cell Tissue Res.* 331: 643-658.

Puvanendran, V., Brown, J.A., 2002. Foraging, growth and survival of Atlantic cod, *Gadus morhua*, larvae reared in different light intensities and photoperiods. *Aquaculture* 214, 131–151.

Sánchez JA, Madrid JA, Sánchez-Vázquez FJ. 2010. Molecular cloning, tissue distribution, and daily rhythms of expression of *per1* gene in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Chronobiol Int.* 2010 Jan; 27(1):19-33.

Sanchez-Vazquez FJ, Azzaydi M, Martinez FJ, Zamora S, Madrid JA. (1998). Annual rhythms of demand-feeding activity in sea bass evidence of a seasonal phase inversion of the diel feeding pattern. *Chronobiol. Int.* 15: 607-622.

Sanchez-Vazquez FJ, Iigo M, Madrid JA, Zamora S, Tabata, M. (1997). Daily cycles of plasma and ocular melatonin in demand-fed sea Bass, *Dicentrarchus labrax* L. *J. Comp. Physiol. (B)* 167: 409-415.

Sanchez-Vazquez FJ, Madrid JA, Zamora S. (1995). Circadian rhythms of feeding activity in sea bass, *Dicentrarchus labrax* L dual phasing capacity of diel demand-feeding pattern. *J. Biol. Rhythms* 10: 256-266.

Vallone D, Lahiri K, Dickmeis T, Foulkes NS. Start the clock!. Circadian rhythms and development. 2007. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists.* ;236(1):142-55.

Villamizar N, García-Alcazar A., Sánchez-Vázquez. F.J. 2009. Effect of light spectrum and photoperiod on the growth, development and survival of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture* 292, 80–86

Wolken, J.J., 1995. The physical nature of light: the interaction of light with matter and molecules of life. In: Wolken, J.J. (Ed.), *Light detectors, photoreceptors, and imaging systems in nature.* Oxford University Press, New York, pp. 6-16.

Yoseda, K., Yamamoto, K., Asami, K., Chimura, M., Hashimoto, K., Kosada, S., 2008. Influence of light intensity on feeding, growth and early survival of leopard coral grouper (*Plectropomus leopardus*) larvae under mass-scale rearing conditions. *Aquaculture* 279, 55–62.

Ziv L, Gothilf Y. 2006. Circadian time-keeping during early stages of development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 103 (11):4146-51.

Ziv, L., Tovin, A., Strasser, D., Gothilf, Y., 2007. Spectral sensitivity of melatonin suppression in the zebrafish pineal gland. *Exp. Eye Res.* 84, 92-99.



### 3. ONTOGENIA DE LOS RELOJES MOLECULARES EN TRUCHA ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*) DURANTE ESTADIOS TEMPRANOS DEL DESARROLLO.

Davie A<sup>1</sup> and Sanchez JA<sup>2</sup>, Vera LM<sup>1,2</sup>, Sanchez-Vazquez FJ<sup>2</sup> & Migaud H<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Institute of Aquaculture, University of Stirling, Stirling, Scotland, FK9 4LA, UK. <sup>2</sup>Facultad de Biología, Departamento de Fisiología, Universidad de Murcia. Murcia, España.

#### RESUMEN

Los relojes moleculares controlan todos los ritmos biológicos de los organismos. En teleosteos, a pesar de la gran diversidad de especies existentes, el estudio de los relojes moleculares se ha llevado a cabo casi exclusivamente en el pez cebra. La trucha arcoíris podría ser una especie muy interesante para el estudio de la ontogenia de los relojes moleculares ya que presenta un desarrollo embrionario muy largo en comparación con otras especies (i.e. zebrafish), lo cual permite una mayor resolución en el estudio del inicio de la expresión de los genes reloj. En este trabajo se analizó la expresión de los genes reloj *Clock*, *Per1* y *Aanat2* a lo largo del desarrollo embrionario en la trucha arcoíris. Se utilizaron dos grupos de embriones que fueron mantenidos bajo un fotoperiodo 12L:12D y bajo condiciones constantes de luz, LL. Bajo LD, la expresión de *per1* presentó un ritmo circadiano a partir del día 8 post-fertilización (dpf), mientras que la expresión del gen *clock* mostró ritmicidad a partir del primer día. Sin embargo, bajo LL, la expresión de estos genes fue arrítmica o con acrofases alteradas. Por otro lado, *Aanat2* presentó una expresión rítmica a partir de los días 21-22 dpf, bajo LD. Estos resultados sugieren la presencia de relojes moleculares funcionales en embriones de trucha arcoíris durante el desarrollo embrionario. Además, muestran la importancia del fotoperiodo en el inicio o sincronización de los ritmos de expresión de los genes reloj y la posible existencia de mecanismos fotorreceptores no identificados que aparecen antes del desarrollo de estructuras como la pineal y la retina.

**Keyword:** trucha arcoíris, relojes moleculares, ontogenia, genes reloj, fotoperiodo.



## INTRODUCCIÓN

El sistema circadiano permite a los animales “medir el tiempo” y anticiparse a los ciclos diarios de luz y oscuridad. Este sistema es sincronizado por diferentes factores ambientales tales como, la luz, el alimento y la temperatura, siendo la luz o el fotoperiodo, considerada como el sincronizador más potente del sistema circadiano (Cahill, 2002).

Los relojes moleculares constituyen la base del funcionamiento del sistema circadiano. Estas estructuras están constituidas por agrupaciones celulares, en las cuales tiene lugar la expresión de los genes reloj, siguiendo un patrón circadiano autosostenido. Así pues, los genes reloj son los responsables de los ritmos circadianos observables tanto a nivel celular, como a nivel fisiológico e incluso a nivel de comportamiento.

El estudio de la ontogenia de los relojes biológicos moleculares en peces se ha abordado casi exclusivamente en el pez cebra (Kaneko y Cahill, 2005; Ziv y Gothilf, 2006; Cahill, 2002; Vallone et al., 2007). Sin embargo, en muchas otras especies de interés para la acuicultura existen procesos muy diversos como la puesta, el desarrollo embrionario y la metamorfosis que presentan un estricto orden temporal, lo cual sugiere que son regulados o modulados por los relojes moleculares. En este sentido, la trucha arcoíris representa un modelo ideal para el estudio de la ontogenia de los relojes moleculares a lo largo del desarrollo, ya que esta especie presenta un desarrollo embrionario muy largo, en comparación con otros teleósteos, como el pez cebra y la lubina. En el caso del pez cebra, la eclosión tiene lugar aproximadamente el tercer día post-fertilización, mientras que en trucha arcoíris este proceso puede alargarse más de 30 días en función de la temperatura (Bastardo et al., 1992; Omura y Oguri, 1993).

El objetivo de este trabajo fue identificar la presencia de relojes moleculares en huevos y larvas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y describir la expresión de los genes reloj a lo largo del desarrollo embrionario. Además, se investigó el impacto del fotoperiodo sobre su expresión.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### **Mantenimiento de los animales.**

Para este estudio se utilizaron embriones de trucha arcoíris que fueron obtenidos justo después de la fertilización. Los embriones fueron mantenidos a temperatura constante ( $7.1 \pm 0.1$  °C) y bajo dos diferentes fotoperiodos: 12L:12D y bajo iluminación constante (LL), hasta la eclosión, la cual tuvo lugar a los 350°C.día. En los días 1, 8, 21 y 42 post-fertilización (dpf), se tomaron muestras (huevos o larvas) durante un día completo cada 4 horas ( $n=6.7$ ). Las muestras fueron almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis por PCR en tiempo real.

### **Clonación y PCR en tiempo real.**

Las muestras de tejidos fueron homogeneizadas en TRIzol® usando un homogeneizador (Polytron®, PT1200, Kinematica, Switzerland) y se extrajo el RNA total. La concentración de RNA fue determinada por espectroscopia y 1 µg fue utilizado para la síntesis de cDNA con Superscript II Reverse Transcriptase y Oligo-dT (Invitrogen).

En base a las secuencias presentes en el Genbank, se diseñaron primers para amplificar fragmentos de los mRNA de los genes *aanat2*, *per1* y *clock* de trucha arcoíris. Estos fragmentos fueron amplificados por PCR y clonados en el vector p-GEMT (Promega). Se purificaron los plásmidos, se cuantificaron y fueron utilizados para el establecimiento de un patrón para la cuantificación absoluta del número de copias de mRNA de los genes reloj mediante PCR a tiempo real. La PCR en tiempo real fue realizada utilizando SYBR Green y todas las muestras fueron amplificadas por triplicado. Se midieron los niveles de expresión de los genes *Clock*, *Per1*, y *Aanat-2* en todas las condiciones experimentales (LD y LL) y se usó el gen de la B-actina como endógeno para la normalización de los datos.

### **Análisis de Datos**

El análisis de los ritmos de expresión fue realizado con el método de cosinor (Nelson et al., 1979), el cual evalúa si los datos muestran una fluctuación regular sobre un periodo de 24 horas mediante el ajuste a la función coseno por el método de los mínimos cuadrados. Se consideró

que el ritmo era significativo cuando  $p < 0.05$ . La acrofase (pico de expresión) fue expresada en tiempo zeitgeber (encendido de las luces = ZT0).

## RESULTADOS

La expresión del gen *per1* fue detectable desde el día 1 post-fertilización (dpf) y presentó un ritmo circadiano a partir del día 8 dpf, con una acrofase cercana a ZT0 (encendido de las luces). El gen *clock* mostró un ritmo circadiano de expresión a partir de la fertilización y continuó a lo largo del desarrollo embrionario (Fig. 1).

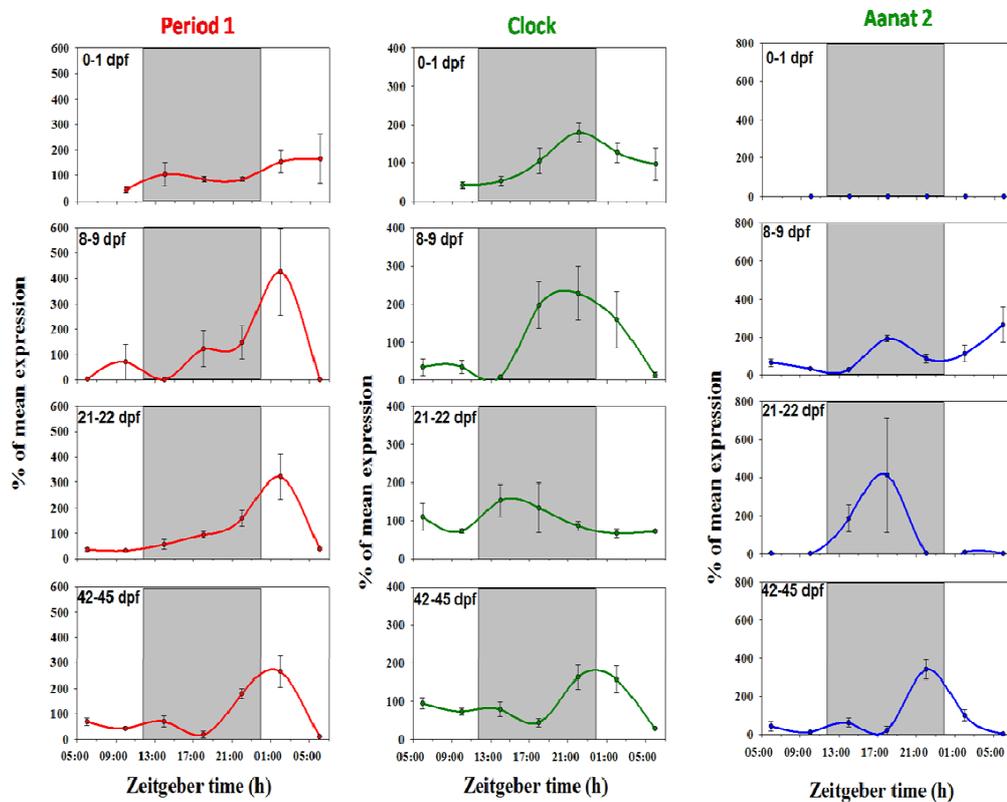


Figura 1. Perfiles de expresión génica de los genes *per1* (izquierda), *clock* (centro) y *Aanat2* (derecha) en embriones de trucha arcoíris a partir de la fertilización y mantenidos bajo un fotoperiodo 12L:12D.

Cuando los embriones fueron mantenidos bajo condiciones constantes de luz, la expresión de los genes reloj fue alterada, mostrándose arrítmica en el caso del gene *clock*, o modificada en el caso de *per1*. Las acrofases para los días 1, 8, 21 y 42, calculadas mediante el análisis de Cosinor, son presentadas en la tabla 1.

Sample	Period 1		Clock	
	LD	LL	LD	LL
0-1 dpf	n.s	n.s	23:0± 1.91	n.s.
8-9 dpf	23:00 ± 1.74	19:00 ± 1.56	23:00 ± 1.91	n.s
21-22 dpf	23:00 ± 2.58	23:00 ±1.29	n.s.	n.s
42-43 dpf	23:00 ± 2.82	n.s.	23:00 ±2.71	n.s

Tabla 1: Acrofases o picos de expresión de los genes *Per1* y *Clock*. El tiempo es mostrado como zeitgeber time (ZT0= encendido de las luces). Las acrofases fueron calculadas por regresión utilizando el método Cosinor (se muestra la acrofase ± 95% intervalo de confianza).

La expresión del gen *Aanat-2* mostró ritmos de expresión diaria, en los días 21 y 42 dpf bajo LD, mientras que bajo LL solo se observaron ritmos circadianos significativos en el día 42 dpf.

## DISCUSIÓN

Los ritmos de expresión detectados, en los genes reloj *per1* y *clock*, durante el periodo de incubación, en embriones de trucha arcoíris, sugieren que los relojes moleculares están presentes y son funcionales durante el desarrollo embrionario de este especie. Estos resultados son concordantes con estudios previos realizados en pez cebra, donde se ha demostrado que los ritmos de expresión de genes reloj, así como los ritmos de melatonina, son detectables a partir del segundo día post-eclosión (Cahill, 2002; Vallone et al., 2007). En nuestros experimentos en trucha, se detectaron ritmos de expresión de genes reloj, también muy pronto (antes del día 8 post-fertilización), pero a diferencia del pez cebra, estos ritmos aparecen ya durante el periodo de incubación. Estas diferencias son debidas probablemente al largo periodo de incubación de la trucha arcoíris, ya que mientras que el pez cebra tiene un periodo de incubación muy corto (2-3 días), esta etapa en la trucha arcoíris puede extenderse más de 30 días, en función de la temperatura (310-410 °C-día, según autores) (Bastardo et al., 1992; Omura y Oguri, 1993). Por otro lado, nuestros resultados son apoyados por algunos estudios realizados en el pez cebra, donde se ha detectado la presencia de transcritos de genes reloj en huevos incluso sin fecundar

(Delaunay et al., 2003), así como durante los primeros días post-fertilización (Ziv y Gothilf, 2006)

Mediante microscopía electrónica Omura y Oguri (1993), demostraron que el órgano pineal en el desarrollo embrionario de trucha, comienza a ser fotorreceptivo aproximadamente a los 15 dpf, y aparece bien desarrollado el día 21 dpf (a 10-12°C), mientras que la retina se desarrolla más tarde, siendo fotosensible aproximadamente el día 27 dpf (a 10-12 °C). Así pues, nuestros resultados indican que la expresión rítmica de *per1* aparece antes del desarrollo de los fotorreceptores clásicos (pineal y retina), lo que sugiere que este ciclo se inicia bien por fotorreceptores aún no identificados o bien es transmitido vía materna al oocito, a través de mRNA materno. Sin embargo, la alteración de la expresión de *clock* y *per1* entre los dos tratamientos, LL y LD, apoya la primera hipótesis, sugiriendo además, que el fotoperiodo es necesario para iniciar o sincronizar estos ritmos de expresión. Por lo tanto, esto implica, la existencia de mecanismos de fotorrecepción, que operan ya en las fases tempranas del desarrollo embrionario. Esta hipótesis es apoyada también por estudios previos realizados en embriones de pez cebra, donde se ha demostrado que pulsos de luz suministrados antes de que la pineal y retina adquieran fotosensibilidad (dos primeros días post-eclosión), inducen la expresión de *per2* y además, sincronizan la expresión de *Aanat2* más tarde (a partir del segundo día) (Ziv y Gothilf, 2006). Además, en el pez cebra se ha descrito también la existencia de un fotorreceptor circadiano en tejidos periféricos que actúa incluso en células en cultivo (Whitmore et al., 2000; Pando y Sassone-Corsi, 2002). Un mecanismo similar podría estar operando en los huevos de trucha arcoíris.

En la mayoría de especies de teleósteos, la pineal fotorreceptiva contiene el reloj circadiano que autorregula la producción/liberación de melatonina. Sin embargo, en salmónidos (como *Oncorhynchus mykiss*, *Oncorhynchus masou*, *Oncorhynchus nerka*), se ha demostrado que la producción de melatonina en el órgano pineal es conducida por luz y no exhibe un ritmo circadiano en DD (Ligo et al., 2007; Migaud et al., 2010; Coon et al., 1998; Masuda et al., 2003). La regulación circadiana de la producción de melatonina en pineal, en la mayoría de teleósteos, esta mediada por la presencia de la secuencia denominada E-box en la región promotora del *Aanat2* (Migaud et al., 2010; Mizasawa et al., 1999; Mizasawa et al., 2000). Este gen es expresado preferentemente en pineal (Benyasi et al., 2000; Mizasawa et al., 2000) y su

expresión exhibe un ritmo circadiano bajo LD que se mantiene al transferir a los animales y a pineales en cultivo *in vitro* a DD. Los salmónidos, sin embargo, constituyen una excepción, ya que en este grupo *aanat2* no presenta ritmos circadianos de expresión en pineal (lo explica que la síntesis de melatonina no este *clock*-regulada, en este grupo) (Mizasawa et al., 1999; Mizasawa et al., 2000). Se ha sugerido que esta peculiaridad puede ser debida a la perdida de la regulación circadiana en salmónidos ancestrales (Ligo et al., 2007). Nuestros resultados en embriones de trucha arcoíris están básicamente en desacuerdo con estas observaciones, ya que se encontraron ritmos de expresión en *Aanat2*, antes del desarrollo de la pineal. No tenemos una explicación clara para este hecho, pero posiblemente la regulación de la expresión de *Aanat2* difiere del adulto en estos estadios tempranos del desarrollo, tanto en la regulación por luz o circadiana, como en los lugares de expresión.

En conclusión, esta es la primera demostración funcional de la existencia de ritmos circadianos en la expresión de genes reloj en embriones de trucha arcoíris. En este estudio se pone de manifiesto la importancia del fotoperiodo para el inicio y sincronización de los relojes moleculares durante el desarrollo embrionario de trucha arcoíris, así como la presencia de mecanismos de fotorrecepción desconocidos que actúan antes del desarrollo de pineal y retina en esta especie. Además, en conjunto, estos resultados, comparados con estudios previos realizados en pez cebra, representan valiosa información sobre la importancia de los relojes moleculares en el desarrollo larvario teleósteos, aunque es evidente que debido a la diversidad de las estrategias de vida en teleósteos, existe una posible variabilidad en la forma en que diferentes especies utilizan este sistema.

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo ha sido financiado por la Universidad de Stirling, Escocia, por el proyecto "Aquagenomics" del MICINN, España y por el proyecto "08743/PI/08" de la Fundación Seneca (Murcia, España).

**REFERENCIAS**

Bastardo, Hilda y Zaida Coche. 1992. Reproductive cycle of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, in the Venezuelan Andes. *ECOTROPICOS*, Vol 5(1):26-31

Benyassi, A., Schwartz, C., Coon, S.L., Klein, D.C., and Falcon, J. (2000): Melatonin synthesis: arylalkylamine N-acetyltransferases in trout retina and pineal organ are different. *Neuroreport*, 11:255-258.

Cahill GM. (2002). Clock mechanisms in zebrafish. *Cell Tissue Res.* 309: 27-34.

Coon, S.L., Begay, V., Falcon, J., and Klein, D.C. (1998): Expression of melatonin synthesis genes is controlled by a circadian clock in the pike pineal organ but not in the trout. *Biology of the Cell*, 90:399-405.

Delaunay F. 2000. An Inherited Functional Circadian Clock in Zebrafish Embryos. *Science*. 289(5477):297-300.

Iigo, M., Abe, T., Kambayashi, S., Oikawa, K., Masuda, T., Mizusawa, K., Kitamura, S., Azuma, T., Takagi, Y., Aida, K., and Yanagisawa, T. (2007): Lack of circadian regulation of in vitro melatonin release from the pineal organ of salmonid teleosts. *General and Comparative Endocrinology*, 154:91-97.

Masuda, T., Iigo, M., Mizusawa, K., Naruse, M., Oishi, T., Aida, K., and Tabata, M. (2003): Variations in plasma melatonin levels of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under various light and temperature conditions. *Zoological Science*, 20:1011-1016.

Migaud H, Davie A and Taylor JF. 2010. Current knowledge on the photoneuroendocrine regulation of reproduction in temperate fish species. *Journal of Fish Biology* (2010) 76, 27–68

Mizusawa, K., Iigo, M., Masuda, T., and Aida, K. (2000): Photic regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase I mRNA in trout retina. *Neuroreport*, 11:3473-3477.

Mizusawa, K., Suetake, H., Iigo, M., and Aida, K. (1999): Arylalkylamine N-acetyltransferase transcription in the retina of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is controlled by light. *Recent Progress in Molecular and Comparative Endocrinology*, 237-240.

Omura Y, Oguri M. 1993. Early development of the pineal photoreceptors prior to the retinal differentiation in the embryonic rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Teleostei). *Arch Histol Cytol.* 56(3):283-91.

Pando MP, Sassone-Corsi P. 2002. Unraveling the mechanisms of the vertebrate circadian clock: zebrafish may light the way. *Bioessays.* 2002; 24(5):419-26

Vallone D, Lahiri K, Dickmeis T, Foulkes NS. Start the clock! Circadian rhythms and development. 2007. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*;236(1):142-55.

Whitmore D, Foulkes NS, Sassone-Corsi P. 2000. Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. *Nature.* 87-91.

Ziv L, Gothilf Y. 2006. Circadian time-keeping during early stages of development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 103 (11):4146-51.

**III.II. EL ALIMENTO COMO SINCRONIZADOR  
DE RELOJES MOLECULARES Y DE LOS RITMOS  
FISIOLÓGICOS Y DE COMPORTAMIENTO.**



#### **4. SINCRONIZACIÓN DE LOS RITMOS DE ACTIVIDAD Y EXPRESIÓN DE GENES RELOJ A LOS CICLOS DE ALIMENTACIÓN EN ZEBRAFISH**

**Sincronización al alimento de los ritmos diarios de actividad locomotora y expresión de genes reloj en cerebro de pez cebra.**

J.A. Sánchez\* and F.J. Sánchez-Vázquez.

Departamento of Fisiología, Facultad of Biología, Universidad of Murcia, 30100, Murcia,  
España.

*Este trabajo ha sido publicado en la revista **Chronobiology International**; 26(6):1120-35.  
(Agosto, 2009).*



**RESUMEN.**

El fotoperiodo y los ciclos de alimentación son fuertes sincronizadores del sistema circadiano de vertebrados. Tanto los ritmos circadianos fisiológicos, como los ritmos de actividad, son fuertemente sincronizados por el fotoperiodo. Además, los ciclos de alimentación periódica inducen la aparición de una Actividad Anticipatoria al Alimento (FAA) en la mayoría de animales. Sin embargo, los mecanismos moleculares a través de los cuales estos sincronizadores, la luz y el alimento, modulan los osciladores biológicos siguen siendo desconocidos. En este estudio hemos investigado la existencia de FAA en 7 grupos de peces cebra, sometidos a un ciclo de luz/oscuridad (LD) o a luz constante (LL) y a diferentes regímenes alimenticios (aleatorio, ayuno y alimentación periódica en mitad de la fase de luz y en mitad de la fase de oscuridad). El objetivo de este estudio fue determinar si los ritmos diarios de comportamiento y la expresión de genes reloj (*per1* and *cry1*), en cerebro de pez cebra, son sincronizados por el fotoperiodo y por el horario de alimentación. Los resultados revelaron que los peces cebra desarrollan FAA cuando el alimento es proporcionado a un hora fija del día, tanto bajo un ciclo LD, como bajo LL. Bajo LD, los peces cebra mostraron la mayoría de su actividad locomotora durante el día, aunque el porcentaje de actividad durante la fase de luz mostró diferencias debidas al régimen de alimentación. Sin embargo, los diferentes tratamientos de alimentación no modificaron los ritmos diarios de expresión de *per1* y *cry1* en cerebro de pez cebra, bajo un ciclo LD (con una acrofase a ZT22 y ZT4, respectivamente; donde ZT0 indica el encendido de luces). Por otro lado, bajo LL, la expresión de *per1* y *cry1* no mostró un ritmo de expresión circadiano significativo independientemente del régimen de alimentación. Estos resultados indican que los peces cebra desarrollan FAA cuando son sometidos a alimentación periódica, pero los ciclos de alimentación tienen poco o ningún efecto sobre la expresión de genes reloj en homogenados de cerebro. Estos resultados sugieren que el oscilador sincronizable por el alimento (FEO) podría estar localizado fuera del cerebro, o bien en una parte concreta y específica del cerebro.

**Keywords:** Pez cebra, Ritmos circadianos, Actividad locomotora, Genes reloj, Alimentación periódica.

## INTRODUCCIÓN

Desde niveles celulares hasta el de organismo completo, los ritmos circadianos de los animales son conducidos por osciladores moleculares. Estos osciladores son sincronizados por ciclos ambientales, como los ciclos de luz/oscuridad y la disponibilidad de alimento. La importancia biológica de estos osciladores circadianos es que permiten a los organismos anticiparse a cambios cíclicos diarios, tanto bióticos, como abióticos (Pardini & Kaeffer, 2006). Aunque la luz es considerada el sincronizador más potente de los ritmos biológicos, el alimento puede ser otro importante sincronizador cuando éste es proporcionado cíclicamente, es decir, todos los días a la misma hora. En estas condiciones, la mayoría de los animales, desarrollan un fenómeno llamado Actividad Anticipatoria al Alimento (FAA, del inglés Food anticipatory Activity) que consiste, básicamente, en un incremento de los niveles de actividad varias horas antes de la llegada del alimento (Mistlberger, 1994; Reebbs & Lague, 2000). La FAA ha sido muy estudiada en mamíferos, pero también aparece en otros vertebrados e invertebrados. En todo ellos se ha propuesto la existencia de un oscilador endógeno sincronizado por los ciclos de alimentación periódica, que ha sido llamado “Oscilador Sincronizable por el Alimento” (FEO, del inglés, “feeding-entrainable oscillator”) (Aranda et al., 2001; Davidson et al., 2003; Sánchez-Vázquez et al., 1997; Stephan, 2002).

En mamíferos, el núcleo supraquiasmático (NSC) del hipotálamo contiene el oscilador circadiano central que coordina los ritmos de comportamiento y los ritmos fisiológicos del organismo. La luz ambiental sincroniza indirectamente este oscilador, induciendo cambios en la fase del ritmo de expresión de los genes reloj. (Challet, 2007). Además, se ha demostrado que en mamíferos, los relojes moleculares también están presentes en tejidos periféricos y en otras partes del cerebro (Abe et al., 2002; Schibler et al., 2003; Yoo et al., 2004; Dardente & Cermakian, 2007). El modelo actual establece que el NSC actúa sincronizando éstos relojes periféricos (Yoo et al., 2004) y como un reloj central (Cuninkova & Brown, 2008).

Por otro lado, la localización anatómica del FEO en mamíferos continúa siendo desconocida (Stephan, 2002). En algunos estudios se ha descrito que ciertos relojes moleculares de tejidos periféricos y de cerebro, podrían ser sincronizados por los ciclos de alimentación. Sin embargo, no está claro si el reloj central del NSC está implicado en el desarrollo de la FAA

(Feillet et al., 2006). Por otro lado, en peces, se conoce muy poco acerca de la existencia tanto de un reloj central comparable al de mamíferos, como de un FEO.

En los últimos años, el pez cebra ha sido muy utilizado para el estudio del reloj molecular de vertebrados y el mecanismo de acción de este reloj ha sido bien caracterizado a nivel molecular, encontrándose algunas diferencias respecto al de mamíferos. En el pez cebra, muchas células y tejidos presentan relojes moleculares, pero en contraposición a mamíferos, todos ellos pueden ser sincronizados directamente por los ciclos de luz-oscuridad, lo cual sugiere que estos relojes periféricos presentan un alto grado de autonomía (Cermakian et al., 2000; Tamai et al., 2005). Además, en pez cebra no se ha identificado un reloj central como el del SCN de mamíferos, lo cual también sugiere que el sistema circadiano de esta especie está muy descentralizado (Cahill, 2002; Pando & Sassone-Corsi, 2002). Otra de las diferencias de los relojes moleculares del pez cebra, es que la expresión rítmica de *per2* es estrictamente dependiente de la luz ambiental (Pando et al., 2001; Pando & Sassone-Corsi, 2002). En adición, *cry1* es inducido fuertemente por luz y es un gen crítico en la sincronización de los relojes circadianos por este zeitgeber. (Tamai et al., 2007).

El efecto del horario de alimentación sobre el comportamiento y la fisiología también ha sido estudiado en teleósteos (Noeske-Hallin et al., 1985; Spieler & Clougherty, 1989; Spieler & Noeske, 1984; Weber & Spieler, 1987). Tanto el FEO, como la FAA, han sido descritos en algunas especies de peces (aunque hasta la fecha, no habían sido descritos en pez cebra), sugiriendo que los ciclos de alimentación pueden actuar como potentes sincronizadores de los ritmos de comportamiento y de los procesos digestivos en teleósteos (Aranda et al., 2001; Azzaydi et al., 2007; Sánchez-Vázquez et al., 2001; Sánchez-Vázquez & Madrid, 2001; Vera et al., 2007). La naturaleza endógena del FEO ha sido demostrada en el carpín, el cual muestra FAA bajo condiciones de oscuridad constantes (DD) que se mantienen varios días en curso libre al retirar el alimento (Sánchez-Vázquez et al., 1997). Sorprendentemente, la cuestión de si los relojes moleculares del cerebro están implicados en la sincronización al alimento todavía no ha sido estudiada en peces. En mamíferos, algunos estudios sugieren que *per2* podría estar relacionado con la FAA (Feillet et al., 2006; Mistlberger, 2006); sin embargo, en pez cebra, *per2* no es un buen candidato para explicar la FAA, ya que en esta especie *per2* está regulado estrictamente por luz (Pando & Sassone-Corsi, 2002). Por otro lado, el estudio *per1* en relación

con la FAA podría ser interesante ya que este gen ha sido muy utilizado como indicador de la fase de los relojes moleculares y además, es considerado un gen crucial en la sincronización de la expresión de otros genes reloj y en la sincronización de los ritmos de comportamiento (Numano et al., 2006).

El objetivo de este estudio fue investigar si los peces cebra sometidos a alimentación periódica muestran un comportamiento anticipatorio y si el alimento es capaz de modular los patrones de comportamiento rítmico normales, así como la expresión de genes reloj (*per1* y *cry1*) en cerebro.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Animales y mantenimiento.**

Para este estudio se utilizaron peces cebra de  $0.4 \pm 0.13$  g. Los animales fueron mantenidos en acuarios de 60 litros (20/ por acuario). El agua fue aireada y recirculada atravesado un filtro biológico (EHEIM, Germany). La temperatura del agua fue controlada y mantenida a 25°C por medio de un calentador (100 W, Askoll) presente en cada acuario. La iluminación fue proporcionada por tubos fluorescentes colocados a 18 cm sobre la superficie del agua y cuyo espectro mostró los mayores picos a 438, 471, 547, and 658 nm (GRO-LUX, 40 W, Germany). El alimento consistió en escamas comerciales (Nutron, Hi-Fi, Prodac), y fue proporcionado por comederos automáticos (EHEIM, model 3581, Germany). Los comederos para los grupos sometidos a alimentación aleatoria fueron acoplados a un reloj (Data Micro, Orbis, España) que fue programada aleatoriamente dejando intervalos de entre 12 y 36 horas entre comedias, de manera que todos los grupos experimentales recibieran la misma cantidad de alimento.

La actividad locomotora fue registrada por medio de fotocélulas infrarrojas (Omron, 3S-AD62, Japan; wavelength = 880 nm) colocadas en cada acuario (a 10 cm desde el fondo y 7 cm desde el lado). Las fotocélulas fueron conectas a un ordenador, de manera que cada vez que el haz infrarrojo de la fotocélula era interrumpido se podría una señal que era almacenada en la computadora. El número de interrupciones del haz infrarrojo era almacenado cada 10 min a

través e un software diseñado para la adquisición de datos. En este capítulo el tiempo es mostrado en tiempo zeitgeber (encendido de luces = ZT0).

Todos los procedimientos fueron realizados conforme a la legislación Española sobre bienestar animal y prácticas de laboratorio y siguiendo los estándares de esta revista (Portaluppi et al., 2008).

### **Diseño experimental**

El objetivo de este estudio fue investigar el papel de alimento como sincronizador de los ritmos de actividad locomotora y de la expresión de genes reloj en cerebro de pez cebra. Para ello, los peces cebra fueron sometidos a una única comida diaria que fue proporcionada cada día a la misma hora o bien, a una hora aleatoria. El fotoperiodo fue de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad (LD), en los grupos donde dos sincronizadores estaban presentes ( luz y alimento), o bien se utilizó luz constante (LL) para evitar el efecto del ciclo LD y las posibles interferencias con la sincronización al alimento. Además, se estudió el efecto de ayuno bajo las mismas dos condiciones, LD y LL. Para llevar a cabo esto, se diseñaron 7 grupos experimentales (con tres replicas de cada uno):

Cuatro grupos fueron mantenidos bajo un ciclo 12:12 LD. El primer grupo fue alimentado una vez al día a una hora aleatoria (grupo RF-LD); el segundo fue mantenido en ayuno durante dos semanas (grupo FF-LD); el tercer grupo fue alimentado periódicamente una vez al día en mitad de la fase de luz (grupo SF-ML), el cuarto grupo fue alimentado una vez al día en mitad de la fase de oscuridad (grupo SF-MD).

Los otros tres grupos experimentales fueron mantenidos bajo luz constante (LL). El primer grupo fue alimentado a horas aleatorias (grupo RF-LL); el segundo grupo fue alimentado aleatoriamente durante las primeras tres semanas y después sometido a ayuno durante las dos últimas semanas (grupo FF-LL), mientras que el tercer grupo fue alimentado periódicamente a ZT18 (grupo SF-LL).

Después de cinco semanas bajo estos diferentes regímenes de alimentación y fotoperiodo, los peces fueron sacrificados y diseccionados a lo largo de un día completo cada 5 horas (ZT3, ZT7, ZT11, ZT15, ZT19 y ZT23). Tres cerebros completos de diferentes peces

cebra fueron aislados y almacenados a -80°C en TRIzol (Invitrogen) para su posterior análisis por PCR en tiempo real.

### **PCR en tiempo real.**

Las muestras de cerebro fueron homogeneizadas en TRIzol® usando un homogeneizador de tejidos (POLYTRON®, PT1200, Kinematica, Switzerland) y procesadas usando el kit PureLink Micro-to-Midi Systems (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 1 µg de RNA fue tratado con DNase I amplification grade (1 unit/µg RNA, Invitrogen). La síntesis de cDNA fue realizada con Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) y Oligo (dT)18 (Invitrogen) en un volumen de reacción de 20 µl. La PCR en tiempo real fue realizada utilizando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) y ABI Prism 7500 a (Applied Biosystems). El software “ABI Sequence Detection System 7000” (Applied Biosystems) fue programado para realizar el siguiente protocolo: 95°C-10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C-15 s y 60°C-1 min. Las amplificaciones fueron realizadas en un volumen de 20 µl, el cual contenía los primers y la Master mix de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Applied Biosystems). Todas las muestras fueron amplificadas por triplicado. Los primers fueron diseñados utilizando el programa Primer Express (Applied Biosystems) y sintetizados por Invitrogen. La eficiencia de la amplificación, especificidad de los primers y cantidad de cDNA por amplificación fue testada por el método de la curva-estándar. La expresión relativa para *perl* y *cry1* fue calculada por el método delta-CT con corrección de eficiencia y utilizando el gen GAPDH (gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa) como gen de referencia (GAPDH) (Tang et al., 2007). Los primers usados fueron los siguientes: 5'-CGCTGGCATCTCCCTCAA-3' y 5'-TCAGCAACACGATGGCTGTAG-3' para *gapdh*, 5'-GCCGTGTTATCCGCACATACT-3' y 5'-CAGCCCACTAGGTTGGACCAT-3' para *perl*; 5'-GGCCGCCGCACTGA-3' y 5'-GGCAGGAAAACCCCTTAAGACT-3' para *cry1a*.

### **2.5 Análisis de datos.**

La actividad locomotora fue monitorizada durante las últimas dos semanas del experimento, y los datos fueron analizados por un software de cronobiología (EL TEMPS® by Prof. A. Díez Noguera, Universidad de Barcelona), Excel, y SPSS. Los análisis estadísticos de

la expresión relativa de *perl* y *cry1* fueron realizados por ANOVA factorial seguido por el test de Bonferroni. El análisis de los ritmos fue realizado por el método del Cosinor (Nelson et al., 1979) el cual evalúa si un conjunto de datos muestra una fluctuación regular con un periodo definido (24h) mediante el ajuste a la función coseno de los datos. Nosotros consideramos que un ritmo era significativo cuando  $p < 0.05$ . La acrofase (tiempo del día en cual la variable muestra el mayor nivel) es mostrado como tiempo zeitgeber (encendido de luces = ZT0). Estos análisis fueron realizados utilizando el programa “EL TEMPS®” (Prof. A. Díez Noguera, Universidad de Barcelona).

## RESULTADOS

### Ritmos de actividad locomotora y FAA.

Bajo un ciclo LD, los peces cebra mostraron un comportamiento diurno, con la mayoría de la actividad locomotora centrada en la fase de luz, pero modulada por el horario de alimentación. Los grupos alimentados periódicamente (SF) mostraron la mayoría de la actividad alrededor de la hora de alimentación. (Fig. 1). Curiosamente, el grupo SF-ML mostró una FAA más evidente en la segunda mitad del experimento. Los patrones de actividad locomotora en los grupos RF-LD y FF-LD fueron similares, mostrando una actividad locomotora mantenida a lo largo de la fase de luz (Fig. 2A y 2B). El porcentaje de actividad en la fase de luz fue del 81.6% de la actividad total en el grupo RF-LD y del 85.6% en el grupo FF-LD. En contraste, los grupos alimentados periódicamente (SF-ML y SF-MD) mostraron diferencias en sus patrones de actividad locomotora relacionadas con el horario de alimentación (Fig. 2C y 2D). El grupo SF-ML mostró una actividad locomotora mayor en la fase de luz, la cual fue del 93.2% de la actividad diaria total (Fig. 2C), mientras que el grupo SF-MD mostró un 63.1% de actividad total durante día (Fig. 2D).

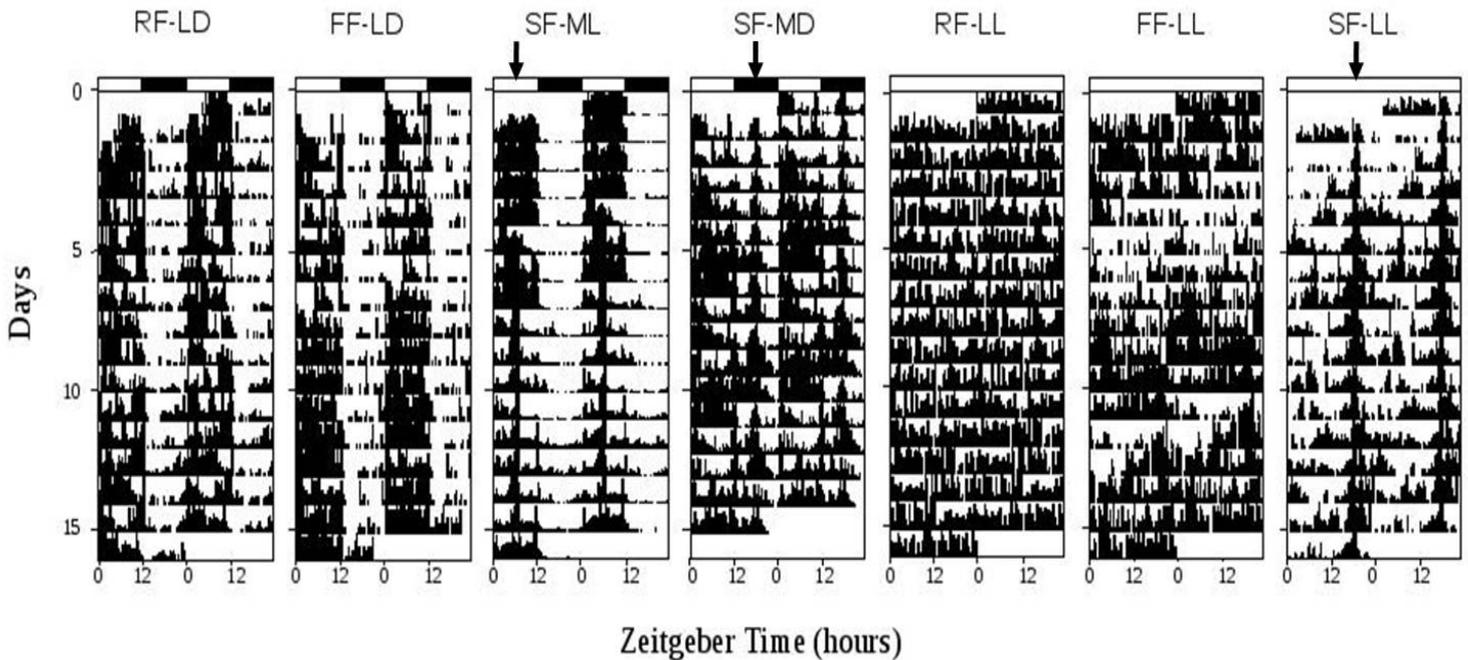


Figura 1. Actogramas representativos de actividad locomotora en pez cebra sometidos a diferentes regímenes de luz y de alimentación durante las últimas dos semanas del experimento. Bajo LD, los grupos de peces cebra fueron alimentados aleatoriamente (RF-LD), mantenidos en ayuno (FF-LD), alimentados periódicamente en mitad de la fase de luz (SF-ML), o en mitad de la fase de oscuridad (SF-MD). Bajo LL, los peces cebra fueron alimentados aleatoriamente (RF-LL), mantenidos en ayuno (FF-LL) y alimentados periódicamente (SF-LL). Las flechas indican la hora de alimentación. Las barras indican el fotoperiodo: ciclo 12L:12D y LL. Las barras en cada línea de los actogramas representan el número de interrupciones de fotocélulas infrarrojas. El tiempo es mostrado en tiempo zeitgeber (encendido de las luces = ZT0).

Los grupos de peces cebra alimentados periódicamente bajo un ciclo LD (SF-ML y SF-MD), incrementaron su actividad locomotora en las horas previas a la llegada del alimento (FAA). Sin embargo, se observaron ciertas diferencias entre estos grupos experimentales (Fig. 2C y 2D). EL grupo SF-ML mostró un incremento mayor en la actividad locomotora durante las dos horas previas a la hora de alimentación, con un 21.9% de la actividad total concentrada en este periodo. Después de la alimentación, este grupo mantuvo una actividad alta a lo largo del resto de la fase de luz (Fig. 2C). Por otro lado, los peces cebra alimentados durante la fase de oscuridad (grupo SF-MD), mostraron solamente un 12.6% de su actividad total diaria durante las 2 h previas a la llegada del alimento (Fig. 2D). La actividad anticipatoria media (2 h antes de

la alimentación) observada en SF-ML y SF-MD, fue significativamente mayor que los valores basales (t-test pareado,  $p < 0.05$ ).

Bajo LL, los grupos sometidos a alimentación aleatoria (RF-LL) y ayuno (FF-LL) mostraron una actividad locomotora sostenida durante el día, sin picos de actividad (Fig. 1, 3A y 3B). Sin embargo, el grupo SF-LL mostró un pico de actividad locomotora justo en la hora de la que el alimento era dispensado, así como FAA durante las dos horas previas a la hora de alimentación (equivalente al 13.4% de la actividad total) (Fig. 3C).

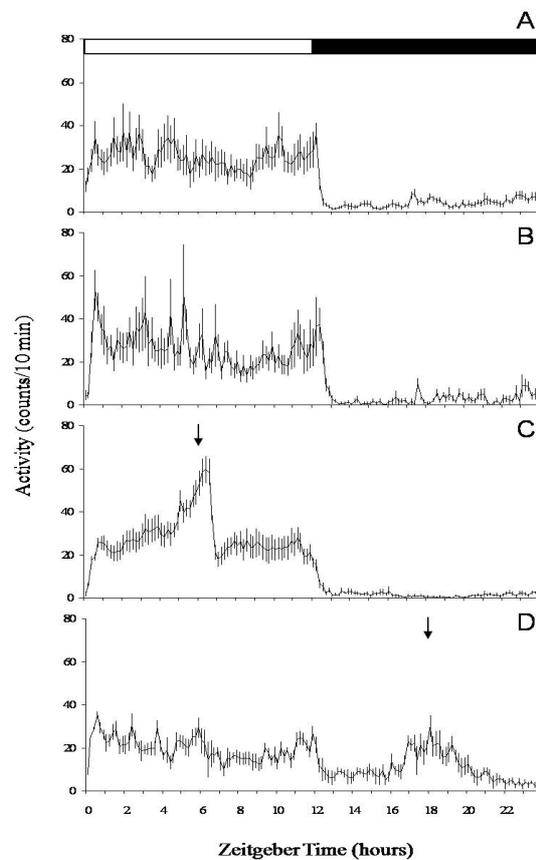


Figura 2. Ondas medias de la actividad locomotora de los grupos de peces cebra sometidos a un ciclo 12L:12D y a diferentes regímenes de alimentación: aleatorio (RF-LD, A), ayuno (FF-LD, B), alimentación periódica en mitad de la fase de luz (SF-ML, C) y en mitad de la fase de oscuridad (SF-MD, D). Los valores representan la media  $\pm$  S.E.M. de las interrupciones de las fotocélulas en intervalos de 10 minutos a lo largo de las dos últimas semanas del experimento. Los diferentes grupos experimentales mostraron diferentes patrones de actividad locomotora, aunque la media de actividad no mostró diferencias significativas. Las barras indican el fotoperiodo y las flechas marcan la hora de alimentación. El tiempo es mostrado en tiempo zeitgeber (encendido de luces = ZT0).

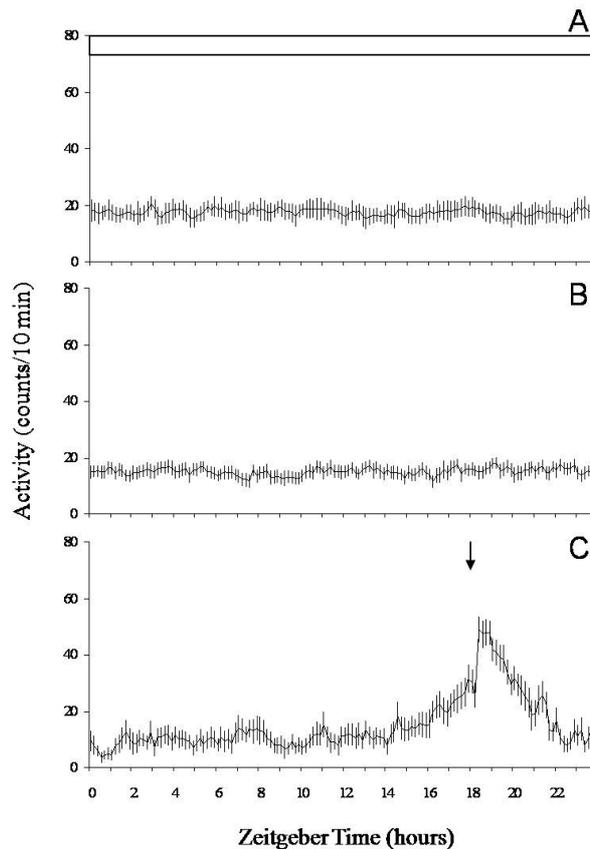


Figura 3. Ondas medias de actividad locomotora de los grupos de peces cebra sometidos a LL y a diferentes regímenes de alimentación: aleatorio (RF-LL, A), ayuno (FF-LL, B), o alimentación periódica (SF-LL, C). Los valores representan la media  $\pm$  S.E.M. de las interrupciones de las fotocélulas en intervalos de 10 minutos a lo largo de las dos últimas semanas del experimento. Los diferentes grupos experimentales mostraron diferentes patrones de actividad locomotora, aunque la media de actividad no mostro diferencias significativas. Las flechas indican la hora de alimentación.

### Expresión de genes reloj.

En los grupos de peces cebra sometidos a un ciclo LD (RF-LD, FF-LD, SF-ML y SF-MD), la expresión de los genes reloj, *per1* y *cry1*, mostró patrones similares a lo largo del día, independientemente del régimen de alimentación (Fig. 4). La expresión de *per1* mostró altos niveles durante la fase de oscuridad y descendió durante la fase de luz (Fig. 4A), mientras que el perfil de expresión de *cry1* mostró bajos niveles durante la fase de oscuridad y altos niveles durante la fase de luz (Fig. 4B). El análisis de ANOVA (factorial) reveló que no hubo interacciones significativas, entre el tiempo y el régimen de alimentación (grupo experimental),

en la expresión de los dos genes para los grupos sometidos a LD. Sin embargo, la expresión relativa de *per1* y *cry1* mostró una variación significativa en función del tiempo del día ( $p < 0.05$ ). El análisis cosinor reveló que ambos genes mostraron ritmos circadianos significativos de expresión génica bajo un ciclo LD ( $p < 0.05$ ), sin diferencias en la acrofase. La acrofase media fue localizada entre ZT21.1 y 22.8 (i.e., al final de la fase de oscuridad) para *per1*, y entre ZT3.5 y 4.0 para *cry1* (Fig. 4).

Bajo LL, la expresión de *per1* y *cry1* en los grupos RF-LL, FF-LL, y SF-LL no mostró un patrón circadiano (Fig. 5). El análisis de cosinor no reveló un ajuste significativo a la función coseno.

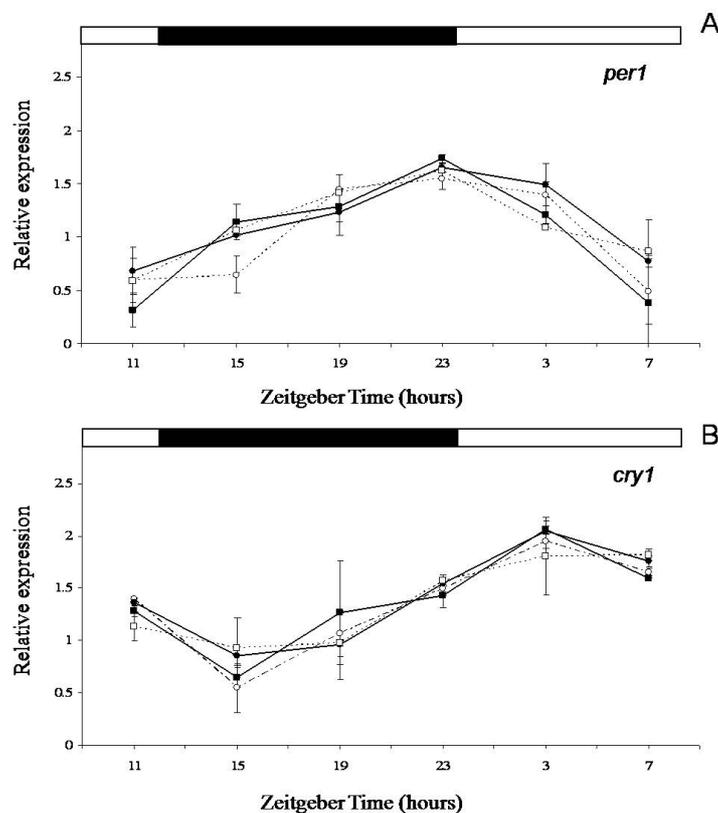


Figura 4. Expresión relativa de *per1* (A) y *cry1* (B) en homogenados de cerebro completo de peces cebra bajo un ciclo LD. Se representan cuatro grupos experimentales bajo un ciclo LD y diferentes regímenes de alimentación: Alimentación aleatoria (grupo RF-LD; línea discontinua y círculos blancos), ayuno (grupo FF-LD; línea discontinua y cuadrados blancos), alimentación periódica en mitad de la fase de luz (ZT6) (grupo SF-ML; círculos negros) y alimentación periódica en mitad de la fase de oscuridad (ZT18) (grupo SF-MD; cuadrados negros). La expresión relativa fue normalizada usando el gen *GADPH* como endógeno. Los datos son representados como la media  $\pm$  S.E.M. de tres cerebros diferentes. Se encontraron variaciones significativas entre en función del tiempo ( $p < 0.05$ ), pero no entre grupos.

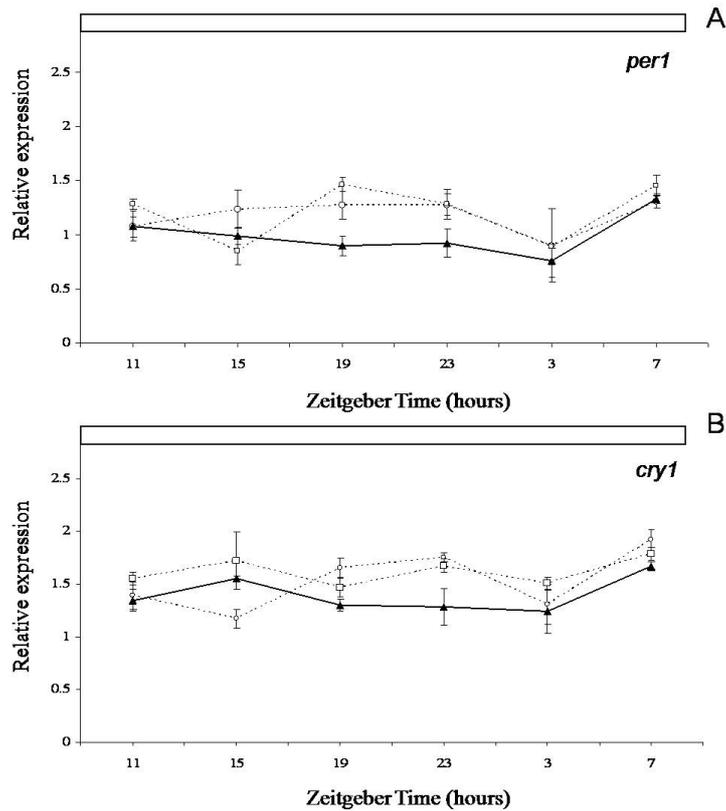


Figura 5. Expresión relativa de *per1* (A) y *cry1* (B) en homogenados de cerebros completos de peces cebra bajo luz continua. Tres grupos experimentales fueron sometidos a LL y diferentes regímenes de alimentación: (grupo RF-LL; línea discontinua y círculos blancos), ayuno (grupo FF-LL; línea discontinua y cuadrados blancos) y alimentación periódica (SF-LL; triángulos negros). La expresión relativa fue normalizada utilizando el gen *GADPH* como gen endógeno. Los datos son representados como la media  $\pm$  S.E.M. de tres cerebros diferentes. No hubieron ritmos circadianos significativos en ningún grupo experimental (cosinor,  $p < 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

En el presente estudio mostramos que los ritmos de actividad locomotora en pez cebra son sincronizados por el fotoperiodo y por el horario de alimentación, cuando ambos sincronizadores están presentes de forma cíclica. Los peces cebra alimentados todos los días a la misma hora (SF) mostraron FAA bajo un fotoperiodo LD y bajo condiciones constantes de luz (LL). En el primer caso, la alimentación periódica fue capaz de inducir FAA durante la fase activa de los animales (fotofase) y durante la fase inactiva (oscuridad), aunque en ambos casos, los peces cebra continuaron mostrando la mayoría de su actividad locomotora durante la fase de luz, independientemente del régimen de alimentación. Por otro lado, la expresión de genes reloj

(*per1* y *cry1*) a nivel de homogenados de cerebros completos fue sincronizada principalmente por el fotoperiodo, y no por el horario de alimentación. Además, en ausencia de un ciclo LD, la expresión de estos genes no mostró un ritmo de expresión circadiana ni de sincronización al alimento (SF-LL).

El alimento puede ser un potente sincronizador para los ritmos circadianos cuando este es restringido o proporcionada periódicamente, i.e., todos los días a la misma hora (Stephan, 2002). Nuestros resultados muestran que los peces cebra desarrollan FAA cuando son sometidos a alimentación periódica, independientemente del fotoperiodo. La FAA ha sido descrita previamente en otras especies de teleósteos (Reebs & Lague, 2000; Sánchez-Vázquez & Madrid, 2001; Vera et al., 2007), y uno de los aspectos que la caracterizan es el incremento de la actividad locomotora en las horas previas a la hora de alimentación que aparece pocos días después del establecimiento de los ciclos de alimentación. Además, en un estudio en carpines sometidos a alimentación periódica, la FAA fue mantenida en curso libre durante días después de la privación de alimento, lo que sugiere la existencia de un oscilador endógeno responsable del desarrollo de FAA (Sánchez-Vázquez et al., 1997).

La importancia biológica de la sincronización de los ritmos biológicos al alimento está relacionada con la capacidad de anticiparse a la llegada o disponibilidad del alimento. En la naturaleza, el alimento no está disponible constantemente, sino que sufre de variaciones espaciales y temporales. Por esta razón, la búsqueda de alimento se restringe normalmente, a ciertos periodos en los cuales la abundancia de alimento es mayor y la presencia de depredadores menor (Sánchez-Vázquez & Madrid, 2001). Por otro lado, la FAA no solamente implica cambios comportamentales, sino que también se dan cambios fisiológicos asociados. Por ejemplo, en mamíferos se ha descrito un incremento en la temperatura corporal y la corticosterona plasmática (Feillet et al., 2006) y en carpines, la alimentación periódica provoca un incremento en la secreción de amilasa 2 h antes de la llegada del alimento (Vera et al., 2007), lo que prepara al animal para una mejor utilización del alimento. Así pues, la habilidad de predecir la llegada del alimento es claramente beneficiosa para los animales.

El pez cebra es considerado típicamente como una especie diurna que muestra la mayoría de su actividad durante el día (Cahill, 2002; Hurd et al., 1998). Nuestros resultados confirman estos patrones de comportamiento, aunque la alimentación periódica fue capaz de

moldurar estos patrones, incrementando la actividad locomotora en la fase en la cual, el alimento fue proporcionado. Resultados similares han sido descritos en otras especies de peces (Reebs & Lague, 2000). En general, los teleósteos muestran ritmos circadianos plásticos que podrían permitir una rápida adaptación a cambios ambientales bruscos, tales como los cambios en la disponibilidad de alimento (Sánchez-Vázquez & Madrid, 2001).

En contraposición a mamíferos, todos los tejidos del pez cebra son sensibles directamente a la luz (Whitmore et al., 2000). La luz sincroniza los relojes moleculares, reseteando la fase y periodo de los genes reloj, cuya expresión permanece acoplada al ciclo LD. En el pez cebra, el gen *cry1a* juega un papel clave en la sincronización por luz del reloj de pez cebra, ya que la luz induce la expresión de *cry1a* y la proteína Cry1 interacciona directamente con las proteínas Clock y Bmal induciendo su disociación (Tamai et al., 2007). En nuestros experimentos, los ritmos diarios de expresión de *perl* y *cry1* en homogenados de cerebros, se mantuvieron en fase con el ciclo LD en todos los grupos experimentales, indicando que la luz actúa como un sincronizador muy potente. Además, bajo LL, la expresión de los genes *perl* y *cry1* no mostró un ritmo circadiano, aunque la actividad locomotora si fue sincronizada por el ciclo de alimentación. En consecuencia, estos resultados sugieren que los relojes moleculares presentes en cerebro de peces cebra son sincronizados principalmente por luz, mientras que el oscilador sensible a los ciclos de alimentación y que modifica los ritmos de comportamiento, en presencia de un ciclo de alimentación, podría estar localizado fuera del cerebro. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que esté presente en una o varias partes específicas del cerebro, de manera que la expresión de los genes reloj en los homogenados de cerebro enmascararía los cambios en la expresión de genes reloj en estos sitios específicos.

Tanto los relojes moleculares de pez cebra, como los ritmos de comportamiento, pueden ser también sincronizados por sincronizadores no fóticos, tales como los ciclos de temperatura. Bajo LL y un termociclo (26:20oC, Termofase:criofase, TC), los ritmos de actividad de pez cebra son sincronizados fuertemente a la termofase, mientras que a temperatura constante los peces cebra previamente sincronizados a termociclos mostraron ritmos en curso libre (López-Olmeda et al., 2006). Además, aunque el reloj circadiano es auto-ajustado para mantener un cierto periodo bajo un amplio rango de temperaturas (compensación), la expresión de ciertos genes reloj en el pez cebra, bajo LL, es fuertemente influenciado por los ciclos de temperatura

(Lahiri et al., 2005). Sin embargo, nuestros resultados no están totalmente de acuerdo con estas observaciones ya que los ciclos de alimentación, como sincronizador no fótico, no modificaron la expresión de *per1* y *cry1* en cerebros de pez cebra bajo LL y LD.

La alimentación aleatoria es capaz de sincronizar los osciladores circadianos presentes en cerebro de mamíferos. La fase de los ritmos de expresión de genes reloj se ajustada a los ciclos de alimentación periódica en el cortex cerebral, hipocampo y cuerpo estriado (Mendoza, 2007; Wakamatsu et al., 2001). Sin embargo, existe cierta controversia sobre si los ciclos de alimentación periódica son capaces de sincronizar el reloj central del SNC de mamíferos. Algunos estudios sugieren que la alimentación periódica sincroniza el reloj central de mamíferos (Damiola et al., 2000; Schibler & Sassone-Corsi, 2002; Stokkan et al., 2001), mientras otros estudios recientes muestran que cuando la alimentación periódica es acoplada a restricción calórica, la expresión de genes reloj en el SCN es sincronizada a ciclos de alimentación (Mendoza et al., 2005). Además, en otros estudios se ha descrito una sincronización del reloj del SCN sin restricción calórica (Abe et al., 2007; Castillo et al., 2004). Básicamente, nuestros resultados en pez cebra no están de acuerdo con los anteriores estudios ya que la alimentación periódica no fue capaz de sincronizar el ritmo diario de expresión de los genes reloj bajo LD. Además, la expresión de *per1* y *cry1* bajo LL, no mostró ningún ritmo significativo y ni la alimentación aleatoria, ni el ayuno, mejoraron el efecto sobre la expresión de *per1* y *cry1*. En resumen, nuestros resultados muestran que la alimentación periódica no fue capaz de sincronizar la expresión de *per1* y *cry1* en homogenados de cerebro, aunque no podemos descartar la posibilidad de que aéreas específicas del cerebro sean sincronizadas. Así pues, se necesitan más estudios, por ejemplo mediante hibridación in situ, para aclarar este aspecto.

El análisis de las mutaciones en los genes reloj ha revelado que algunos, pero no todos, los genes reloj están implicados en la FAA en roedores. Generalmente, la mayoría de mutaciones en los genes reloj no afectan a la FAA, a excepción de mutaciones en *per2* (Feillet et al., 2006; Mistlberger, 2006). Así pues, *per2* podría estar implicada en la FAA de mamíferos, aunque en pez cebra es menos probable, ya que la expresión de *per2* es estrictamente dependiente del fotoperiodo (Pando & Sassone-Corsi, 2002). Las implicaciones de los genes *cry* en la FAA, también han sido testeadas en mamíferos (Iijima et al., 2005). Iijima et al. mostró

que el gen *cry1* no es necesario para la sincronización al alimento, pero que la total deficiencia en mCry afecta a la estabilidad y el desarrollo de FAA. En mamíferos, *per1* es considerado crucial para la sincronización del comportamiento y de la oscilación molecular de los genes reloj (Numano et al., 2006), aunque mutaciones en el gen *per1* no impiden el desarrollo de FAA. Así pues, la FAA ha sido bien caracterizada a nivel de comportamiento y fisiológico en peces, pero el control genético continúa siendo desconocido y serían de interés estudios con mutantes/knock-out para elucidar que genes están implicados en el desarrollo de FAA.

En resumen, nuestros resultados muestran que la alimentación periódica sincroniza los ritmos de actividad locomotora, pero no es capaz de modificar la fase de la expresión de los genes *per1* y *cry1* en homogenados de cerebro, los cuales permanecen sincronizados exclusivamente por el fotoperiodo. La alimentación periódica moduló los patrones de actividad locomotora de peces cebra de manera que los grupos SF mostraron FAA. Bajo LL, los ritmos de actividad locomotora de peces cebra fueron sincronizados por alimentación periódica, mientras que los grupos bajo alimentación aleatoria o ayuno fueron totalmente arrítmicos. Para concluir, estos resultados sugieren que la sincronización al alimento de los ritmos de comportamiento es mediada por un oscilador sincronizable por el alimento, aunque su localización sigue sin conocerse.

## **AGRADECIMIENTOS**

Estos experimentos han sido financiados por el proyecto AGL 2007-66507-C02-02 y “Aquagenomics” (nº 28502) del ministerio de Ciencia y Tecnología de España (MCIN) concedidos a FJSV and la beca predoctoral concedida JASF por el MCIN.

## **REFERENCIAS**

Abe M, Herzog ED, Yamazaki S, Straume M, Tei H, Sakaki Y, Menaker M, Block GD. (2002). Circadian rhythms in isolated brain regions. *J. Neurosci.* 22: 350-356.

Abe H, Honma S, Honma K. (2007). Daily restricted feeding resets the circadian clock in the suprachiasmatic nucleus of CS mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292: 607-615.

Aranda A, Madrid JA, Sanchez-Vazquez FJ. (2001). Influence of light on feeding anticipatory activity in goldfish. *J. Biol. Rhythms* 16: 50-57.

Azzaydi M, Rubio VC, López FJ, Sánchez-Vázquez FJ, Zamora S, Madrid JA. (2007). Effect of restricted feeding schedule on seasonal shifting of daily demand-feeding pattern and food anticipatory activity in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) . *Chronobiol. Int.* 24: 859-874.

Cahill GM. (2002). Clock mechanisms in zebrafish. *Cell Tissue Res.* 309: 27-34.

Castillo MR, Hochstetler KJ, Tavernier RJ, Jr., Greene DM, Bult-Ito A. (2004). Entrainment of the master circadian clock by scheduled feeding. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287: 551-555.

Cermakian N, Whitmore D, Foulkes NS, Sassone-Corsi P. (2000). Asynchronous oscillations of two zebrafish CLOCK partners reveal differential clock control and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 4339-4344.

Challet E. (2007). Minireview: Entrainment of the suprachiasmatic clockwork in diurnal and nocturnal mammals. *Endocrinology* 148: 5648-5655.

Cuninkova L, Brown SA. (2008). Peripheral circadian oscillators: interesting mechanisms and powerful tools. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1129: 358-370.

Damiola F, Le MN, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, Schibler U. (2000). Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* 14: 2950-2961.

Dardente H, Cermakian N. (2007). Review: Molecular circadian rhythms in central and peripheral clocks in mammals. *Chronobiol. Int.* 24:195-213.

Davidson AJ, Poole AS, Yamazaki S, Menaker M. (2003). Is the food-entrainable circadian oscillator in the digestive system? *Genes Brain Behav.* 2: 32-39.

Feillet CA, Albrecht U, Challet E. (2006). "Feeding time" for the brain: a matter of clocks. *J. Physiol. Paris* 100: 252-260.

Hara R, Wan K, Wakamatsu H, Aida R, Moriya T, Akiyama M, Shibata S. (2001). Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells* 6: 269-278.

Hurd MW, DeBruyne J, Straume M, Cahill GM. (1998). Circadian rhythms of locomotor activity in zebrafish. *Physiol. Behav.* 65: 465-472.

Iijima M, Yamaguchi S, van der Horst GT, Bonnefont X, Okamura H, Shibata S. (2005). Altered food-anticipatory activity rhythm in Cryptochrome-deficient mice. *Neurosci. Res.* 52: 166-173.

Lahiri K, Vallone D, Gondi SB, Santoriello C, Dickmeis T, Foulkes NS. (2005). Temperature regulates transcription in the zebrafish circadian clock. *PLoS. Biol.* 3: e351.

Lopez-Olmeda JF, Madrid JA, Sanchez-Vazquez FJ. (2006). Light and temperature cycles as zeitgebers of zebrafish (*Danio rerio*) circadian activity rhythms. *Chronobiol. Int.* 23: 537-550.

Mendoza J, Graff C, Dardente H, Pevet P, Challet E. (2005). Feeding cues alter clock gene oscillations and photic responses in the suprachiasmatic nuclei of mice exposed to a light/dark cycle. *J. Neurosci.* 25: 1514-1522.

Mendoza J. (2007). Circadian clocks: setting time by food. *J. Neuroendocrinol.* 19: 127-137.

Mistlberger RE. (1994). Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 18: 171-195.

Mistlberger RE. (2006). Circadian rhythms: perturbing a food-entrained clock. *Curr. Biol.* 16: 968-969.

Nelson W, Tong YL, Lee JK, and Halberg F. (1979). Methods for cosinor-rhythmometry. *Chronobiologia* 6: 305-323.

Noeske-Hallin TA, Spieler RE, Parker NC, Suttle MA. (1985). Feeding time differentially affects fattening and growth of channel catfish. *J. Nutr.* 115: 1228-32.

Numano R, Yamazaki S, Umeda N, Samura T, Sujino M, Takahashi R, Ueda M, Mori A, Yamada K, Sakaki Y, Inouye ST, Menaker M, Tei H. (2006). Constitutive expression of the *Period1* gene impairs behavioral and molecular circadian rhythms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 3716-3721.

Pando MP, Sassone-Corsi P. (2002). Unraveling the mechanisms of the vertebrate circadian clock: zebrafish may light the way. *Bioessays* 24: 419-426.

Pando MP, Pinchak AB, Cermakian N, Sassone-Corsi P. (2001). A cell-based system that recapitulates the dynamic light-dependent regulation of the vertebrate clock. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 10178-10183.

Pardini L, Kaeffer B. (2006). Feeding and circadian clocks. *Reprod. Nutr. Dev.* 46: 463-480.

Portaluppi F, Touitou Y, Smolensky MH. (2008). Ethical and methodological standards for laboratory and medical biological rhythm research. *Chronobiol. Int.* 25: 999-1016.

Reebs SG, Lague M. (2000). Daily food-anticipatory activity in golden shiners. A test of endogenous timing mechanisms. *Physiol. Behav.* 70: 35-43.

Sanchez-Vazquez FJ, Madrid JA. (2001). Feeding Anticipatory Activity. *Food Intake in Fish*. Blackwell Science Ltd, pp. 216-232.

Sanchez-Vazquez FJ, Madrid JA, Zamora S, Tabata M. (1997). Feeding entrainment of locomotor activity rhythms in the goldfish is mediated by a feeding-entrainable circadian oscillator. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural Behav. Physiol.* 181: 121-132.

Sanchez-Vazquez FJ, Aranda A, Madrid JA. (2001). Differential effects of meal size and food energy density on feeding entrainment in goldfish. *J. Biol. Rhythms* 16: 58-65.

Schibler U, Sassone-Corsi P. (2002). A web of circadian pacemakers. *Cell* 111: 919-922.

Schibler U, Ripperger J, Brown SA. (2003). Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. *J. Biol. Rhythms* 18: 250-260.

Spieler RE, Clougherty JJ. (1989). Free-running locomotor rhythms of feeding-entrained goldfish. *Zool. Sci.* 6: 813-816.

Spieler RE, Noeske TA. (1984). Effects of photoperiod and feeding schedule on diel variations of locomotor activity, cortisol, and thyroxine in goldfish. *Trans. Am. Fish. Soc.* 113: 528-539.

Stephan FK. (2002). The "other" circadian system: food as a Zeitgeber. *J. Biol. Rhythms* 17: 284-292.

Stokkan KA, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y, Menaker M. (2001). Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* 291: 490-493.

Tamai TK, Carr AJ, Whitmore D. (2005). Zebrafish circadian clocks: cells that see light. *Biochem. Soc. Trans.* 33: 962-966.

Tamai TK, Young LC, Whitmore D. (2007). Light signaling to the zebrafish circadian clock by Cryptochrome 1a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 14712-14717.

Tang R, Dodd A, Lai D, McNabb WC, Love DR. (2007). Validation of zebrafish (*Danio rerio*) reference genes for quantitative real-time RT-PCR normalization. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 39: 384-390.

Vera LM, De PN, Gomez-Milan E, Delgado MJ, Sanchez-Muros MJ, Madrid JA, Sanchez-Vazquez FJ. (2007). Feeding entrainment of locomotor activity rhythms, digestive enzymes and neuroendocrine factors in goldfish. *Physiol. Behav.* 90: 518-524.

Wakamatsu H, Yoshinobu Y, Aida R, Moriya T, Akiyama M, and Shibata S (2001) Restricted-feeding-induced anticipatory activity rhythm is associated with a phase-shift of the expression of mPer1 and mPer2 mRNA in the cerebral cortex and hippocampus but not in the suprachiasmatic nucleus of mice. *Eur. J. Neurosci.* 13: 1190-1196

Weber DN, Spieler RE. (1987). Effects of the light-dark cycle and scheduled feeding on behavioral and reproductive rhythms of the cyprinodont fish, Medaka, *Oryzias latipes*. *Experientia* 43: 621-624.

Whitmore D, Foulkes NS, Sassone-Corsi P. (2000). Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. *Nature* 404: 87-9.

Yoo SH, Yamazaki S, Lowrey PL, Shimomura K, Ko CH, Buhr ED, Slepka SM, Hong HK, Oh WJ, Yoo OJ, Menaker M, Takahashi JS. (2004). *PERIOD2::LUCIFERASE* real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 5339-5346



**5. EFECTO DE LOS CICLOS DE ALIMENTACIÓN SOBRE LOS RITMOS DE ACTIVIDAD Y LA RESPUESTA AL ESTRÉS EN DORADA (*Sparus aurata*, Linnaeus, 1758).**

**Efecto de los ciclos de alimentación periódica sobre los ritmos de actividad locomotora y la respuesta a estrés en dorada (*Sparus aurata*).**

J.A. Sánchez, J.F. López-Olmeda, B. Blanco-Vives, F.J. Sánchez-Vázquez. Departamento de Fisiología, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, 30100 Murcia, Spain

*Este trabajo ha sido publicado en la revista **Physiology and Behavior** 4;98(1-2):125-9. (Agosto,2009)*



**RESUMEN**

Los ritmos biológicos son fuertemente sincronizados por los ciclos de alimentación. Esto permite a los animales anticipar la llegada del alimento optimizando la ingesta y utilización de nutrientes, lo cual contribuye a mejorar el bienestar animal. En este capítulo, se estudio el efecto de los ciclos de alimentación en dorada (*Sparus aurata*). Para ello, se utilizaron dos grupos experimentales, uno de los cuales recibió el alimento de forma aleatoria durante el periodo de luz (RF), mientras que el otro recibió el alimento siempre a la misma hora (SF), en mitad de la fase de luz. Ambos grupos mostraron un comportamiento diurno, aunque el grupo SF mostró un menor porcentaje de actividad durante el día (84.4% vs. 79.5% en los grupos RF y SF respectivamente). Además, el grupo SF mostró Actividad Anticipatoria al Alimento (FAA) durante las horas previas a la hora de la alimentación. La media de la actividad locomotora total del grupo RF fue significativamente mayor que la del grupo SF (3132 vs. 2654 cuentas/día, respectivamente). En cuanto al incremento de biomasa, el peso medio fue diferente en ambos grupos en el día 30 del experimento (115.7 g en el grupo RF y 125.6 g en el grupo SF), pero estas diferencias desaparecieron en el día 60. Por otro lado, los niveles de cortisol y glucosa plasmáticos fueron diferentes en ambos grupos (cortisol: 71.8 vs. 8.7 ng/ml, glucosa: 53.7 vs. 43.8 mg/dl en RF y SF, respectivamente), mientras que el lactato no mostro diferencias significativas. Estos resultados sugieren que el horario de alimentación, periódico o aleatorio, afecta al comportamiento y fisiología de la dorada, indicando que una comida diaria suministrada de forma periódica es beneficiosa para el bienestar animal, debido probablemente a que los animales pueden prepararse y anticipar llegada del alimento.

**Keywords:** Ciclos de alimentación, dorada, estrés, bienestar animal, FAA.

## INTRODUCCIÓN

La mayoría de los animales, incluidos los teleósteos, muestran ritmos diarios de comportamiento, concentrando su actividad motora, bien durante el día, o bien durante la noche, pero generalmente, no a lo largo de las 24 horas. Estos patrones rítmicos de comportamiento son el resultado de la influencia del ciclo día/noche generado por el movimiento de rotación del planeta, que ha actuado como una fuerza selectiva a lo largo de la evolución. Los ritmos biológicos relacionados con el comportamiento y diferentes variables fisiológicas, son conducidos por osciladores endógenos presentes en el cerebro, los cuales son sincronizados por señales ambientales, tales como el fotoperiodo y los ciclos de alimentación. Sin embargo, en ausencia de señales ambientales, los relojes biológicos mantienen su ritmicidad y los ritmos biológicos persisten entrando en curso libre, revelando su propio periodo, el cual suele diferir de los ciclos ambientales a los cuales se mantienen normalmente sincronizados (Pardini y Kaeffer, 2006; Sánchez-Vázquez et al., 1997).

En la naturaleza, la disponibilidad de alimento no es constante ni continua, si no que varía tanto en función del tiempo, como del espacio. Así pues, el alimento aparece a menudo restringido a periodos específicos del día. Esta situación es fácilmente reproducible en el laboratorio mediante el establecimiento de un ciclo de alimentación, es decir, proporcionado o restringiendo el alimento, a un cierto momento o periodo del día. Bajo estas condiciones, la mayoría de animales muestran un incremento en la actividad locomotora en las horas previas a la hora de alimentación, fenómeno denominado “Actividad Anticipatoria al Alimento” (FAA) (Sánchez-Vázquez y Madrid, 2001). La primera evidencia de FAA en peces fue proporcionada por Davis (Davis, 1963), quien demostró que los carpines incrementan su actividad locomotora de 1 a 3 h antes de la hora de alimentación, cuando son sometidos a alimentación periódica. Estas observaciones fueron confirmadas más tarde por varios autores (Sánchez-Vázquez et al., 1997; Sánchez-Vázquez y Madrid 2001; Davis, 1963; Spieler, 1992; Spieler y Noeske 1984). La FAA no solamente implica cambios de comportamiento (como el incremento en la actividad locomotora), sino que también implica cambios fisiológicos que permiten a los animales optimizar sus procesos digestivos y metabólicos (Davidson y Stephan; 1999). El significado adaptativo de la FAA es que permite a los animales anticiparse a un evento recurrente, en este caso el alimento, de manera que éstos pueden prepararse y optimizar el uso del alimento y de sus

nutrientes (Strubbe y Dijk; 2002). En carpines sometidos a alimentación periódica, se ha mostrado que la secreción de factores digestivos y endocrinos incrementa unas 2 horas antes de la alimentación, mientras que los peces sometidos a alimentación aleatoria no muestran ésta anticipación, ni en cuanto a comportamiento, ni en cuanto a variables endocrinas o digestivas (Vera et al., 2007).

La alimentación es un factor clave en el bienestar animal en peces (Huntingford et al., 2006). Sin embargo, la mayoría de estudios se han centrado en el diseño de dietas óptimas para mejorar el crecimiento de especies de interés comercial como la dorada (*Sparus aurata*) (Caballero et al., 2006; Benedito-Palos et al., 2008), pero se conoce el posible impacto del horario de alimentación sobre el bienestar animal. Además, en dorada, el crecimiento puede ser maximizado cuando el alimento es distribuido de manera que coincida con sus ritmos normales de actividad (Azzaydi et al., 1999).

El objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia del horario de alimentación (periódica frente aleatoria) sobre los ritmos diarios de actividad locomotora de dorada y sobre parámetros indicadores de bienestar animal, como el crecimiento, cortisol plasmático y otros metabolitos relacionados: glucosa y lactato.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Animales y mantenimiento**

Para este estudio se utilizaron 40 doradas adultas proporcionadas por una empresa de acuicultura local y con un peso medio de  $108 \pm 8$  g (media  $\pm$  S. D.). El experimento fue llevado a cabo en el laboratorio de la Estación Naval de la Algameca (ENA, Murcia, España). Para ello, se utilizaron seis tanques de poliéster de 100 litros de capacidad conectados a un sistema abierto de recirculación de agua. El fotoperiodo utilizado fue un ciclo 12:12 LD, con el encendido de las luces a las 8:00 h, y la temperatura de fue constante y de 20 °C. Durante la fase de luz, la intensidad lumínica en la superficie del agua fue de aproximadamente 300 lux.

### **Diseño experimental**

Los peces fueron divididos en seis grupos experimentales, con n=8 doradas por tanque. Tres grupos fueron sometidos a alimentación periódica (SF) y otros tres grupos fueron expuestos a alimentación aleatoria pero restringida a la fase de luz (RF). El alimento fue proporcionado por comederos automáticos (EHEIM, modelo 3581, Alemania) colocados en cada tanque y controlados por un temporizador digital (Data Micro, Orbis, España), conectado a los comederos y programado semanalmente para cada día de la semana. Los peces fueron alimentados solamente una vez al día. En el caso de los grupos SF el alimento se suministro siempre a las 14:00 horas (en mitad de la fase de luz), mientras que en los grupos RF fue dispensado durante la fase de luz, a horas aleatorias. La cantidad de alimento liberado por los comederos fue ajustada al 1% de la biomasa del tanque en el inicio del experimento y en el día 30. Tanto el alimento liberado por los comederos, como el alimento no consumido fue controlado semanalmente para asegurar que todos los grupos consumían la misma cantidad de alimento. Una fotocélula infrarroja (OMRON E3S-AD62, Japón) fue colocada a 40 cm de profundidad en cada tanque para registrar la actividad locomotora de cada grupo. Todas las fotocélulas fueron conectadas a una computadora, en la cual fueron almacenados los datos para futuros análisis. La toma de muestras se realizó siempre a las 12:00 horas. Los peces muestreados (24 para cada régimen de alimentación) fueron anestesiados y pesados en los días 1, 30 y 60 del experimento. El último día del experimento, el día 60, se obtuvieron muestras de sangre para el análisis de cortisol y otros metabolitos del plasma. Los peces fueron anestesiados utilizando aceite de clavo (Guinama, Valencia), previamente disuelto en 10 ml de etanol y después disuelto en el agua quedando a una concentración final de 50 µl/l. Las muestras de sangre fueron obtenidas de la vena caudal utilizando jeringuillas heparinizadas. Por último, el plasma fue separado de las células por centrifugación durante 15 min a 3000 ×g y almacenadas a -80 °C para su posterior análisis.

### **Análisis de cortisol, glucosa, y lactato**

Los niveles de cortisol plasmáticos fueron medidos radioinmunoensayo utilizando un kit comercial (Demeditec Diagnostics GMBH, Alemania). El lactato fue estimado utilizando un kit colorimétrico (Spinreact, Barcelona), y los valores de glucosa fueron determinados utilizando un glucometer (GLUCOCARD Gmeter, Menarini Laboratories, Barcelona). La

sensibilidad del ensayo para el cortisol (de acuerdo con el fabricante) fue de 0.07 µg/dl, determinada a  $-2$  S.D. de Bo (n=20). El coeficiente de variación intra-ensayo fue de 9.1%, calculado utilizando muestras de dorada. Este valor está muy próximo al suministrado por el fabricante (7.7%).

## RESULTADOS

### **Análisis de ritmos de actividad locomotora**

Todos los animales mostraron la mayoría de su actividad durante la fotofase, aunque los actogramas revelaron diferencias entre los dos tratamientos (Fig. 1). El diurnalismo, o porcentaje medio de actividad durante el día, fue del  $84.4\% \pm 1.8\%$  para los peces alimentados aleatoriamente (grupo RF), mientras que para los peces alimentados de forma periódica (grupo SF) fue de  $79.5\% \pm 1.4\%$  (t-test,  $p < 0.05$ ). También se observaron diferencias en los perfiles de actividad diaria. La onda media del grupo RF no mostró picos a lo largo del día, por el contrario, el grupo SF mostró un incremento de su actividad locomotora, justo antes de la hora de alimentación, conocido como actividad anticipatoria al alimento (FAA) (Fig. 2). En este último grupo, el perfil de actividad disminuyó gradualmente después de la alimentación, aproximándose a la línea de actividad locomotora basal durante la fase de oscuridad e incrementándose de nuevo con el encendido de las luces. Los niveles de actividad diaria totales, también mostraron diferencias entre ambos grupos, siendo significativamente mayores en el grupo RF que en el grupo SF ( $3132 \pm 217$  vs.  $2654 \pm 209$  cuentas/día  $\pm$  S.E.M., respectivamente) (t-test,  $p < 0.05$ ) (Fig. 3).

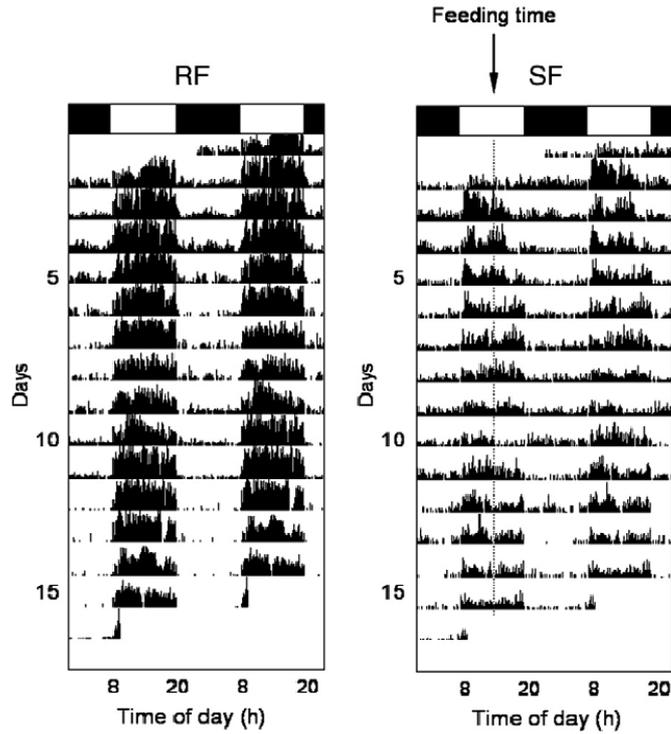


Figura 1. Actogramas representativos de la actividad locomotora en doradas sometidas a alimentación aleatoria (RF) y alimentación periódica (SF). Las barras de la parte superior de los actogramas indican los periodos de luz y oscuridad diarios.

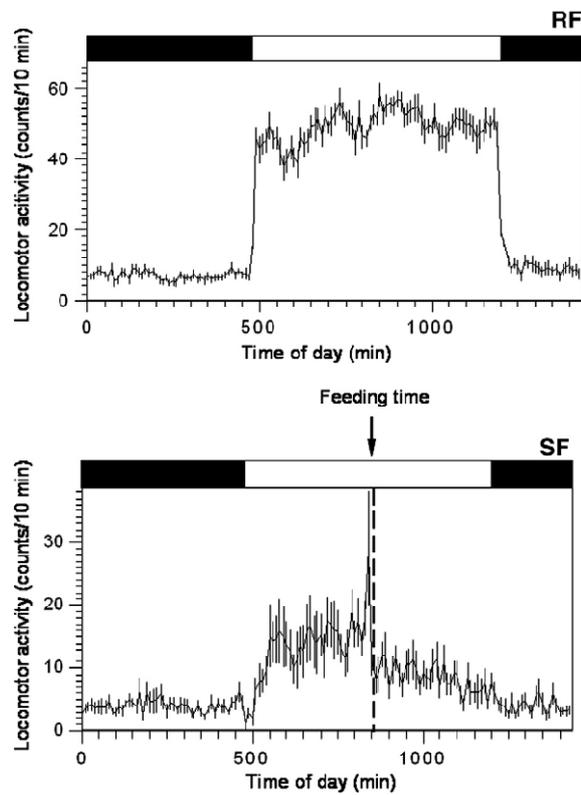


Figura 2. Ondas medias la actividad locomotora de doradas sometidas a alimentación aleatoria (RF) y periódica (SF). Corresponden a la media de la actividad locomotora de todos los días del experimento de las tres réplicas o tanques de cada tratamiento. La actividad (eje y) es expresada como el número de interrupciones del haz infrarrojo cada 10 minutos. Las barras en la parte superior indican el fotoperiodo. La línea de puntos indica la hora de alimentación del grupo SF.

### Incremento de biomasa

El peso de todos los peces ( $n=24$  para cada tratamiento de alimentación), fue determinado a las 12:00 h en los días 1, 30 y 60 del experimento, con el propósito de monitorizar la evolución del crecimiento durante el experimento. Al inicio del experimento, en el día 1, ambos grupos mostraban un peso medio similar, pero a lo largo del experimento se encontraron diferencias. El análisis mediante ANOVA de dos vías, reveló diferencias en la biomasa media, en función del tiempo ( $p<0.0001$ ) y en función del régimen de alimentación ( $p<0.05$ ). Sin embargo, las diferencias de biomasa encontradas en el día 30 desaparecieron al final del experimento, donde la biomasa media fue similar en ambos grupos ( $134.3\pm 3.1$  vs.  $134.7\pm 3.6$  g, SF y RF, respectivamente) (Fig. 4).

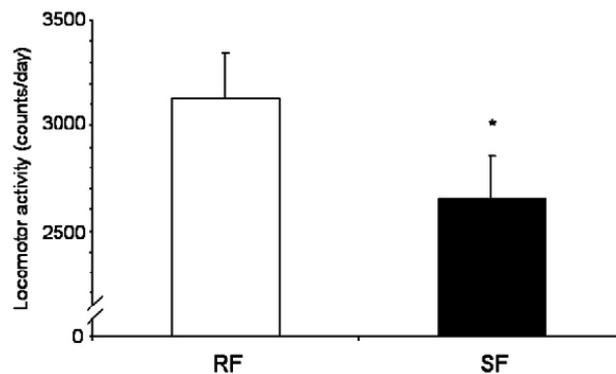


Figura 3. Actividad locomotora media total del grupo RF (barra blanca) y del grupo SF (barra negra). Se representa la media de cuentas por día de las tres réplicas de cada tratamiento, al final del experimento. Las barras de error representan el error estándar de la media. El asterisco indica diferencias significativas entre ambos grupos ( $t$ -test,  $p<0.05$ ).

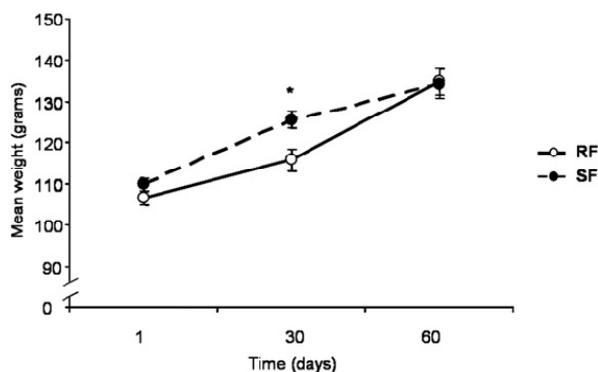


Figura 4. Evolución de la biomasa media en los grupos RF y SF, durante el curso del experimento. Se representa la media.  $\pm$  Error estándar ( $n=24$ ). El asterisco indica diferencias significativas entre ambos grupos (ANOVA, Tukey post-hoc test,  $p<0.05$ ).

### Cortisol, glucosa y lactato

Para evitar el efecto negativo del estrés causado por las extracciones de sangre en los animales, las muestras para el análisis de hormonas y metabolitos plasmáticos, fueron obtenidas solamente en el último día del experimento (día 60). Las muestras fueron tomadas antes de la hora de alimentación en ambos grupos (12:00 h) para evitar el efecto de la alimentación. El análisis del cortisol plasmático mostró marcadas diferencias entre grupos. El grupo RF mostró una concentración de cortisol plasmático mayor (71.8 ng/ml) que el grupo SF (8.7 ng/ml) (t-test,  $p<0.005$ ) (Fig. 5A). También se encontraron diferencias significativas en cuanto a los niveles de glucosa en plasma (53.7 vs. 43.8 mg/dl para el grupo RF y SF, respectivamente, t-test,  $p<0.05$ ) (Fig. 5B). Sin embargo, no se encontraron diferencias en los niveles de lactato (16.9 vs. 16.1 mg/dl en RF y SF, respectivamente) (t-test,  $p=0.58$ ) (Fig. 5C).

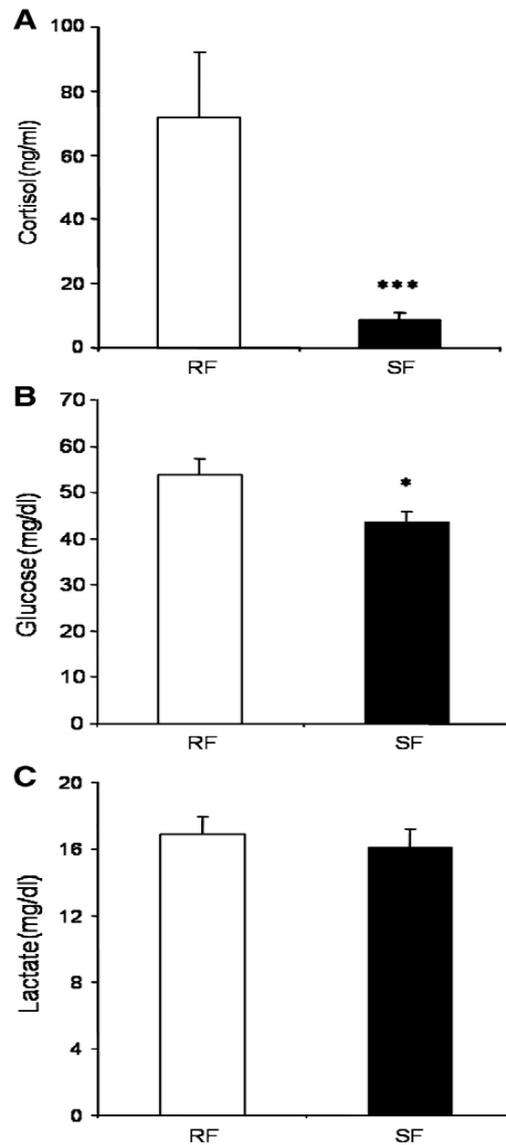


Figura 5. Niveles de cortisol plasmático (A), glucosa (B), y lactato (C) en doradas alimentadas de aleatoriamente (RF) y periódicamente (SF). Se representan la media  $\pm$  Error Estándar ( $n=24$ ). \*\*\* y \* indican diferencias significativas entre ambos grupos ( $t$ -test,  $p < 0.005$  y  $p < 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

Los ciclos de alimentación tienen profundos efectos sobre el comportamiento y la fisiología de teleósteos. Este estudio proporciona nuevas evidencias acerca de la influencia del horario de alimentación sobre los ritmos de comportamiento, hormonas y metabolitos plasmáticos en dorada. Durante el experimento, se observaron diferentes patrones de comportamiento en los grupos RF y SF: el grupo sometido a alimentación periódica, SF, mostró

un incremento de su actividad locomotora en las horas previas a la alimentación. Este pico de actividad de los animales sincronizados al ciclo de alimentación se denomina actividad anticipatoria al alimento (FAA), mientras que la sincronización al alimento denota el proceso interno que acopla los ritmos biológicos a los ciclos de alimentación. La FAA ha sido descrita en diferentes especies de vertebrados, especialmente en mamíferos (Mistlberger, 1994). Sin embargo, en peces, la FAA ha sido menos investigada, y la localización y función del oscilador endógeno que controla la sincronización al alimento sigue siendo desconocida. Varios estudios realizados en carpín han mostrado que la FAA persiste, entrando en curso libre, cuando el alimento es retirado, sugiriendo la existencia de un oscilador endógeno que controla la anticipación al alimento y la FAA (Sánchez-Vázquez y Madrid, 2001). El comportamiento alimentario de la dorada ha sido estudiado previamente utilizando comederos a demanda, los cuales permiten a los peces obtener el alimento en el momento que desean. Usando este sistema, se ha demostrado que, en doradas bajo condiciones constantes, aparece un patrón diurno de alimentación con tres picos (al inicio, mitad y final de la fotofase) (Velázquez et al., 2006). En el presente experimento, de acuerdo con el ritmo diurno espontáneo de alimentación atribuido a esta especie, las doradas fueron alimentadas durante el día y mostraron un comportamiento diurno, independientemente del régimen de alimentación.. Usualmente, los peces responden a la alimentación periódica modulando sus patrones de actividad en función de la hora de la alimentación, de manera que tienden a ser más activos durante la fase en la cual el alimento es proporcionado (día o noche) (Sánchez-Vázquez y Madrid, 2001). En este estudio, tanto los peces alimentados periódica como aleatoriamente, recibieron el alimento automáticamente, pero siempre durante la fotofase. Sin embargo, el porcentaje de diurnalismo fue significativamente mayor en el grupo RF que el grupo SF (84.4% vs. 79.5%, t-test,  $p < 0.05$ ). Estas diferencias no tiene un explicación clara, aunque es posible que este fenómeno este ligado a que los animales alimentados aleatoriamente están bajo la influencia de un solo sincronizador (la luz), mientras que los grupos SF están sometidos a dos sincronizadores (luz y alimento). La luz es un sincronizador de los ritmos biológicos muy potente e induce un alto porcentaje de diurnalismo en comparación con el grupo SF (sincronizado al alimento, pero posiblemente no al fotoperiodo). Al final del experimento, la media de la actividad locomotora total del grupo RF fue mayor que la del grupo SF. Es decir, el grupo RF mantuvo una actividad locomotora mayor, lo que sugiere que al no poder predecir la llegada del alimento, los animales se mantenían en un

estado de alerta constante para prevenir pérdidas de alimento. Además, aunque el grupo SF mostró un mayor grado de actividad antes del alimento, la actividad postprandial fue menor. La FAA es considerada una ventaja adaptativa, de manera que los peces capaces de anticiparse a la llegada del alimento pueden prepararse tanto a nivel de comportamiento como fisiológico. Estudios recientes han demostrado que los carpines alimentados periódicamente muestran un incremento en la secreción de amilasa y neuropéptido Y (NPY) 2 horas antes la hora de alimentación (Vera et al., 2007). Por el contrario, la alimentación aleatoria promueve un estado de activación continuo en los peces, el cual podría ser energéticamente desfavorable. Esto podría explicar las diferencias de biomasa encontradas durante el experimento. Sin embargo, al final del experimento (día 60), tales diferencias desaparecieron. En resumen, estos resultados sugieren la existencia de una habilidad para predecir la llegada del alimento en peces alimentados periódicamente, la cual podría actuar ahorrando energía y consecuentemente mejorando el crecimiento. Sin embargo, este fenómeno podría solo ser válido a corto plazo, ya que al final del experimento el grupo RF compensó el crecimiento alcanzando al grupo SF.

El concepto de bienestar animal es complejo e implica numerosos aspectos científicos y éticos. La alimentación es ciertamente un factor clave que afecta a las condiciones de un animal en cautividad, ya que el alimento debe estar en una cantidad suficiente y con una composición adecuada para el adecuado mantenimiento la salud y del comportamiento normal de los animales (Huntingford et al., 2006). La ingesta es generalmente considerada como un criterio fiable para evaluar el bienestar animal, tanto bajo diferentes condiciones experimentales, como en acuicultura (Damsgard et al., 2004). Sin embargo, hasta la fecha, el efecto del horario de alimentación sobre el bienestar animal en peces es poco conocido. Existe un debate acerca de la elección de indicadores de bienestar animal en peces, dentro de los cuales se incluyen variables comportamentales y fisiológicas. El cortisol plasmático, la glucosa y el lactato han sido a menudo usados como indicadores de estrés en peces (Ashley, 2007). Además, los niveles de glucosa y lactato en plasma están directamente relacionados con los niveles de cortisol, ya que esta hormona juega un papel crucial en el metabolismo de carbohidratos, incrementado los valores plasmáticos de ambos metabolitos. En dorada, los indicadores de estrés, incluyendo los niveles de cortisol, han sido estudiados previamente en relación a cambios de salinidad (Láiz-Carrión et al, 2003), ayuno (Polakof et al., 2006) y confinamiento (Sangiao-Alvarellos et al., 2005). En nuestro experimento, los peces alimentados aleatoriamente mostraron niveles de

cortisol 10 veces mayores que los del grupo SF, siendo estos últimos similares a los descritos previamente bajo condiciones normales en dorada (Sangiao-Alvarellos et al., 2005) y otras especies de teleósteos (Øverli et al., 2002; Moreira et al., 2004; Magee et al., 2006; Barreto et al., 2006). Además, los valores de cortisol del grupo RF también fueron similares a los observados por otros autores bajo circunstancias estresantes variadas como el confinamiento (Arends et al., 1999), el ayuno y alta densidad (Sangiao-Alvarellos et al., 2005), y los cambios de salinidad (Sangiao-Alvarellos et al., 2006), lo que sugiere que los peces alimentados aleatoriamente estaban bajo condiciones de estrés.

El incremento de biomasa podría también ser usado como un indicador de bienestar, ya que condiciones sub-óptimas disminuye el crecimiento. En el presente experimento, se observaron diferencias en la mitad del experimento (día 30), pero no al final (día 60). Cabe destacar, que el análisis para cortisol y glucosa fue testeado solamente en el día 60, cuando la biomasa de ambos grupos fue similar. Así pues, los datos de crecimiento deberían ser interpretados con precaución, ya que éste no es un indicador simple de bienestar en animales por sí solo, y además para la evaluación del bienestar animal deberían ser utilizados múltiples indicadores (Ashley, 2007).

En resumen, estos resultados sugieren que el horario de alimentación (aleatorio o periódico) afectó al comportamiento y fisiología en dorada. La alimentación periódica sincronizó los ritmos de actividad locomotora, induciendo la aparición de FAA. Además, el grupo alimentado de forma aleatoria mostró niveles mayores de cortisol y glucosa plasmáticos. Estos resultados son relevantes para la acuicultura de esta especie, ya que los ciclos de alimentación periódica fueron beneficiosos para el bienestar animal, optimización del crecimiento y mantenimiento de bajos niveles de cortisol y glucosa plasmáticos. En la naturaleza, los ciclos apetito y alimentación son importantes sincronizadores de los ritmos biológicos de peces, por lo que un régimen de alimentación caótico podría conducir a la pérdida de la integración temporal y en consecuencia, producir efectos negativos indeseables.

## AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido financiado por el proyecto AGL 2007-66507- C02-02 del Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCYT, España) concedido a FJSV, por la beca predoctoral concedida JASF por el MCYT y a JFLO por la Universidad de Murcia. Gracias también a “COST ACTION 867 - Welfare of fish in European Aquaculture”.

## REFERENCIAS

Arends RJ, Mancera JM, Muñoz JL, Wendelaar Bonga SE, Flik G. The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to air exposure and confinement. *J Endocrinol* 1999; 163:149–57.

Ashley PJ. Fish welfare: current issues in aquaculture. *Appl Anim Behav Sci* 2007;104:199–235.

Azzaydi M, Martínez FJ, Zamora S, Sánchez-Vázquez FJ, Madrid JA. Effect of meal size modulation on growth performance and feeding rhythms in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Aquaculture* 1999;170:253–66.

Barreto RE, Volpato GL, Pottinger TG. The effect of elevated blood cortisol levels on the extinction of a conditioned stress response in rainbow trout. *Horm Behav* 2006; 50:484–8.

Benedito-Palos L, Navarro JC, Sitjà-Bobadilla A, Gordon Bell J, Kaushik S, Pérez-Sánchez J. High levels of vegetable oils in plant protein-rich diets fed to gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): growth performance, muscle fatty acid profiles and histological alterations of target tissues. *Br J Nutr* 2008;1:1–12.

Caballero MJ, Torstensen BE, Robaina L, Montero D, Izquierdo M. Vegetable oils affect the composition of lipoproteins in sea bream (*Sparus aurata*). *Br J Nutr* 2006;96:830–9.

Damsgard B, Sorum U, Ugelstad I, Eliassen RA, Mortensen A. Effects of feeding regime on susceptibility of Atlantic salmon (*Salmo salar*) to cold water vibriosis. *Aquaculture* 2004;239:37–46.

Davidson AJ, Stephan FK. Plasma glucagon, glucose, insulin, and motilin in rats anticipating daily meals. *Physiol Behav* 1999;66:309–15.

Davis RE. Daily “predawn” peak of locomotion in fish. *Anim Behav* 1963;12:272–83.

Huntingford FA, Adams C, Braithwaite VA, Kadri S, Pottinger TG, Sandøe P, et al. Current issues in fish welfare. *J Fish Biol* 2006;68:332–72.

Láiz-Carrión R, Martín del Río MP, Míguez JM, Mancera JM, Soengas JL. Influence of cortisol on osmoregulation and energy metabolism in gilthead seabream *Sparus aurata*. *J Exp Zool* 2003;298:105–18.

Magee SE, Neff BD, Knapp R. Plasma levels of androgens and cortisol in relation to breeding behavior in parental male bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*. *Horm Behav* 2006; 49:598–609.

Mistlberger RE. Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev* 1994;18:171–95.

Moreira PS, Pulman KG, Pottinger TG. Extinction of a conditioned response in rainbow trout selected for high or low responsiveness to stress. *Horm Behav* 2004; 46:450–7.

Øverli Ø, Kotzian S, Winberg S. Effects of cortisol on aggression and locomotor activity in rainbow trout. *Horm Behav* 2002;42:53–61.

Pardini L, Kaeffer B. Feeding and circadian clocks. *Reprod Nutr Dev* 2006;46:463–80.

Polakof S, Arjona FJ, Sangiao-Alvarellos S, Martín del Río MP, Mancera JM, Soengas JL. Food deprivation alters osmoregulatory and metabolic responses to salinity acclimation in gilthead sea bream *Sparus auratus*. *J Comp Physiol* 2006; 176:441–52.

Sánchez-Vázquez FJ, Madrid JA, Zamora S, Tabata M. Feeding entrainment of locomotor activity rhythms in the goldfish is mediated by a feeding-entrainable circadian oscillator. *J Comp Physiol A* 1997;181:121–32.

Sánchez-Vázquez FJ, Madrid JA. Feeding anticipatory activity. In: Houlihan D, Boujard T, Jobling M, editors. *Food intake in fish*. Blackwell Science; 2001. p. 216–32.

Sangiao-Alvarellos S, Arjona FJ, Martín del Río MP, Míguez JM, Mancera JM, Soengas JL. Time course of osmoregulatory and metabolic changes during osmotic acclimation in *Sparus auratus*. *J Exp Biol* 2005; 208:4291–304.

Sangiao-Alvarellos S, Guzmán JM, Láiz-Carrión R, Míguez JM, Martín del Río MP, Mancera JM, et al. Interactive effects of high stocking density and food deprivation on carbohydrate metabolism in several tissues of gilthead sea bream *Sparus auratus*. *J Exp Zool* 2005; 303:761–5.

Spieler RE, Noeske TA. Effects of photoperiod and feeding schedule on diel variations of locomotor activity, cortisol, and thyroxine in goldfish. *Trans Am Fish Soc* 1984;113:528–39.

Spieler RE. Feeding-entrained circadian rhythms in fishes. In: Ali MA, editor. *Rhythms in fishes*. New York: Plenum; 1992. p. 137–47.

Strubbe JH, Van Dijk G. The temporal organization of ingestive behaviour and its interaction with regulation of energy balance. *Neurosci Biobehav Rev* 2002;26:485–98.

Velázquez M, Zamora S, Martínez FJ. Effect of dietary energy content on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) feeding behaviour and nutritional use of the diet. *Aquac Nutr* 2006;12:127–33.

Vera LM, De Pedro N, Gómez-Milán E, Delgado MJ, Sánchez-Muros MJ, Madrid JA, et al. Feeding entrainment of locomotor activity rhythms, digestive enzymes and neuroendocrine factors in goldfish. *Physiol Behav* 2007;90:518–24.



## **IV. DISCUSIÓN GENERAL.**



En la presente tesis doctoral se investigaron los ritmos biológicos de peces teleósteos y su sincronización tanto a factores bióticos como abióticos. En el primer bloque experimental, mediante el análisis de la expresión de los principales genes reloj, se estudiaron los relojes biológicos moleculares de teleósteos y su ontogenia. En segundo bloque experimental, se estudió efecto del fotoperiodo y de los ciclos de alimentación sobre la sincronización de los relojes moleculares y de los principales ritmos manifiestos (ritmos de actividad locomotora y ritmos hormonales). Para ello, se utilizaron varios modelos experimentales: pez cebra, lubina, dorada y trucha, los cuales resultaban adecuados para los diferentes objetivos de esta tesis doctoral.

Para el estudio de la ontogenia de los relojes moleculares se utilizaron dos especies de teleósteos, la lubina y la trucha. La lubina, es una especie que presenta un sistema circadiano muy plástico y el estudio de la ontogenia de los relojes moleculares en esta especie puede arrojar algo de luz sobre los mecanismos que regulan esta plasticidad. Con este objetivo se llevó a cabo la clonación del gen *per1* de lubina y posteriormente se estudió la expresión de este gen durante el desarrollo larvario. La trucha arcoíris fue seleccionada para profundizar en el estudio de la ontogenia de relojes moleculares en teleósteos debido a su largo periodo de incubación, lo que nos permitía realizar un estudio con mayor resolución que en el caso de lubina. Además, nos permite obtener una visión comparada de la ontogenia de los relojes moleculares, ya que en los salmónidos, a diferencia del resto de teleósteos, el control de la síntesis de melatonina por la pineal no está regulado por osciladores circadianos endógenos.

Por otro lado, el estudio de los efectos sincronizadores de los ciclos de alimentación sobre los relojes moleculares se realizó en pez cebra. El reloj molecular de esta especie ha sido bastante bien caracterizado y además, la secuencia de su genoma está disponible actualmente para la comunidad científica, de manera que resulta un modelo idóneo para los estudios a nivel molecular. Sin embargo, este modelo presenta algunas limitaciones debidas a su limitado tamaño y crecimiento, por lo que para el estudio del efecto de los ciclos de alimentación sobre el crecimiento y ritmos de cortisol plasmático, se seleccionó a la dorada como modelo, la cual nos proporcionó resultados más aplicables.

## IV.I. Relojes moleculares y ontogenia.

Como primer paso para profundizar en el estudio de los mecanismos moleculares que controlan el sistema circadiano de la lubina, se llevo a cabo la clonación y caracterización del gen *per1*, uno de los principales genes que constituyen los relojes moleculares.

Existen múltiples evidencias ritmos circadianos en lubina Europea (*Dicentrarchus labrax*). Esta especie ha sido muy utilizada en nuestro laboratorio, ya que presenta un alto interés tanto cronobiológico, como para la acuicultura mediterránea. En consecuencia, los ritmos circadianos de la lubina han sido bien caracterizados tanto a nivel comportamental, como endocrino (Sánchez-Vázquez et al., 1995, Sánchez-Vázquez et al., 1998), siendo este el primer estudio realizado a nivel molecular. La principal característica de esta especie, y que la hace atractiva para la cronobiología, es su capacidad de invertir sus patrones de comportamiento, de manera que puede comportarse como diurna o como nocturna, en función de la época del año (Sánchez-Vázquez et al., 1995). Sin embargo, los mecanismos que median en estas inversiones son todavía desconocidos y la clonación de este gen abre las puertas a estudios moleculares sobre la plasticidad del sistema circadiano de esta especie.

La secuencia la proteína PER1 de lubina, deducida a partir del gen clonado en el capítulo 1, reveló la presencia de una serie de dominios característicos de la familia de proteínas PERIODS, confirmando que esta proteína está muy conservada tanto en vertebrados, como en invertebrados. Los principales dominios identificados fueron los siguientes:

- Dominio PAS (Per-Arnt-Sim), implicado en la dimerización con otras proteínas reloj (Gu et al., 2005).
- Dominio NES (del inglés, *nuclear export signal*) que contiene la secuencia señal para su transporte o localización nuclear (Vielhaber et al., 2001).
- Dominio o región S/M (del inglés, *short-mutable*) (Tei et al., 1997; Young, 1998).
- Una región rica en los aminoácidos Serina/treonina y glicina en su extremo carboxiterminal (Tei et al., 1997; Young, 1998).

- Varios sitios de fosforilación por Casein Kinasa I (CKI) implicados en la regulación de la localización celular y su translocación al núcleo, así como en la estabilidad y degradación de esta proteína (Agostino et al., 2008).

Por otro lado, en este capítulo se analizó también la expresión de *per1* en diferentes tipos de tejidos, mostrando que *per1* en lubina es expresado tanto en tejidos neuronales (cerebro y la retina), como en tejidos periféricos (corazón, hígado, agallas, musculo, bazo, tejido adiposo y tracto digestivo). Estos resultados son similares a lo descrito tanto en mamíferos como en otras especies de teleósteos (i. e. pez cebra), donde se ha descrito la presencia de relojes moleculares periféricos en diferentes tejidos e incluso también, en células aisladas en cultivo (Whitmore et al., 1998; Yoo et al., 2004). Además, el patrón de expresión a lo largo de un ciclo de 24 horas mostró un ritmo circadiano con una acrofase o pico de expresión cercana al final de la noche, similar a lo descrito para este gen en otros teleósteos, como en el pez cebra y en el carpín (Lahiri et al., 2005; Velarde et al., 2009).

En teleósteos, la ontogenia de los relojes moleculares ha sido investigada exclusivamente en el pez cebra (Cahill, 2002, Vallone et al, 2007), sin embargo, los resultados obtenidos no pueden ser extrapolables a todos los teleósteos, debido a la gran diversidad de formas de vida existentes. Nuestros estudios, realizados en lubina y trucha permiten tener un punto de vista comparado sobre los mecanismos implicados en el establecimiento y desarrollo de la ritmicidad durante el desarrollo embrionario. Desde el punto de vista de la cronobiología, los teleósteos pueden dividirse en dos grandes grupos, los salmónidos y el resto de teleósteos, los cuales difieren entre sí, en la regulación de la síntesis de melatonina en la pineal.

En todos los teleósteos, la pineal es considerada un órgano clave en el funcionamiento del sistema circadiano y en la sincronización de los ritmos circadianos al fotoperiodo. Además, en muchas ocasiones este órgano ha sido propuesto como reloj central de teleósteos, sin embargo, los estudios más recientes demuestran que no actúa como tal, ya que por ejemplo se han descrito ritmos de actividad locomotora en animales pinealectomizados (Sánchez-Vázquez et al., 2000). Por otro lado, es bien conocido que la pineal actúa como un órgano endocrino sintetizando la hormona melatonina y además, contiene un oscilador intrínseco y autónomo, que es sincronizado directamente por la luz a través de los fotopigmentos presentes en este órgano (Falcón, 1999; Falcón et al., 2010). Además, a diferencia de los relojes periféricos, la pineal

transmite su ritmicidad a distintas áreas cerebrales a través de aferencias directas, y al resto del organismo a través de los ritmos circadianos de producción de la hormona melatonina, que a su vez, está involucrada en la regulación de numerosas variables rítmicas diarias y estacionales (Cassone, 1998; Falcón et al., 2010). Sin embargo, en salmónidos (incluyendo la trucha arcoíris), a diferencia del resto de teleósteos, la producción de melatonina en pineal está regulada directamente por luz y no por un oscilador circadiano, por lo que no muestra ritmos circadianos en DD, como ocurre en el resto de especies.

En resumen, los modelos experimentales utilizados en el estudio de la ontogenia de los relojes moleculares, lubina y trucha arcoíris, pertenecen a cada uno de los dos grandes grupos de teleósteos que difieren en la regulación de la síntesis de melatonina. Por un lado, la clonación del gen *per1* de lubina (primer capítulo), nos permitió estudiar estos aspectos en larvas, analizando la expresión de este gen como marcador del desarrollo de los relojes biológicos durante los primeros 16 días post-eclosión. Por otro lado, en trucha arcoíris, se analizó la expresión de los genes reloj, *per1* y *clock*, así como *Aanat-2*, durante los primeros 45 días post-fertilización. Como se ha mencionado, la trucha arcoíris presenta un desarrollo embrionario mucho más lento, con un largo periodo de incubación, lo cual nos permitió analizar con más detalle estos aspectos.

Nuestros hallazgos ponen de manifiesto que tanto el gen *per1* en larvas de lubina, como los genes *per1* y *clock* en huevos de trucha, comienzan a expresarse muy pronto en el desarrollo embrionario, independientemente de las condiciones lumínicas. La presencia de transcritos para estos genes fue detectable antes de la eclosión en ambos casos (el día antes de la eclosión en lubina y el primer día post-fertilización en trucha), aunque en general, la oscilación rítmica apareció más tarde. Estos resultados son apoyados por estudios realizados en pez cebra, donde también se ha detectado la presencia de transcritos para genes reloj poco después de la fertilización e incluso en huevos sin fecundar (Delaunay et al., 2000; Vallone et al., 2007). El significado biológico de la expresión arrítmica temprana de los genes reloj no está claro y podría ser simplemente un paso previo y necesario en el desarrollo de los relojes moleculares. En el pez cebra, también se ha propuesto una herencia materna de transcritos, e incluso se ha postulado una posible sincronización de los relojes embrionarios a través de esta vía (Delaunay et al 2000). Por otro lado, se ha sugerido que los genes reloj podrían tener efectos pleiotrópicos,

teniendo funciones importantes en la regulación del desarrollo embrionario no relacionadas con los relojes moleculares (Vallone et al., 2007), lo cual explicaría su expresión temprana y arrítmica.

Aunque la expresión de genes reloj fue detectable muy pronto, los ritmos de expresión de estos genes fueron detectables en un poco más tarde en el desarrollo. Bajo un fotoperiodo 12L:12D, la expresión rítmica de *per1* fue detectable a partir del día 16 post-eclosión, en lubina y a partir del día 8 post-fertilización en trucha arcoíris. Además, nuestros estudios en larvas de lubina y embriones de trucha mostraron que el comienzo de la expresión rítmica de los genes reloj es afectado por las condiciones lumínicas. Bajo condiciones constantes de luz u oscuridad (en ausencia de un fotoperiodo), no se observaron ritmos circadianos de expresión en *per1* durante los primeros 16 post-eclosión en lubina, y el caso de la trucha arcoíris, la expresión de los genes reloj tampoco mostró ritmos circadianos o bien fueron caóticos y con acrofases alteradas. Estos hallazgos sugieren la luz/fotoperiodo es necesaria para el inicio de un ritmo en la expresión en estos genes, ya que en ausencia de un fotoperiodo, el desarrollo de los relojes moleculares se vio afectado o al menos retrasado. Estos hallazgos son apoyados por diversos estudios realizados en pez cebra, donde se ha demostrado que la luz o el fotoperiodo es indispensable para el iniciar de los ritmos circadianos en la expresión de los genes reloj durante el desarrollo larvario (Ziv y Gothilf, 2006; Dekens y Whitmore, 2006; Kaneko y Cahill, 2005).

En trucha arcoíris, la pineal es la primera estructura fotorreceptiva que se desarrolla y comienza a ser fotorreceptiva aproximadamente a los 15 dpf (Omura y Oguri, 1993). Curiosamente, bajo LD, la expresión rítmica de los genes reloj durante el desarrollo embrionario fue detectable antes del desarrollo de este fotorreceptor, lo que sugiere la existencia de mecanismos de fotorrecepción desconocidos. Esta hipótesis, es apoyada por algunos estudios realizados en el pez cebra, donde se ha identificado un mecanismo de fotorrecepción directa por parte de relojes periféricos y células en cultivo (Whitmore et al., 2000; Pando y Sassone Corsi, 2002). Además, existen evidencias sobre la sincronización de genes reloj y genes *clock*-regulados durante el desarrollo embrionario de pez cebra que ocurren antes del desarrollo de la pineal y retina (Ziv y Gothilf, 2006). Así pues, un mecanismo similar podría estar operando en las primeras etapas del desarrollo embrionario de trucha arcoíris y de lubina.

Además, en el estudio sobre la ontogenia de relojes moleculares de lubina, hemos determinado por primera vez, que la longitud de onda de la luz también es capaz de afectar también la maduración de los relojes moleculares. Mientras que en los huevos/larvas mantenidos bajo un fotoperiodo 12L:12D con luz azul se detectó un ritmo en expresión de *perl* antes que en los mantenidos bajo un fotoperiodo de luz blanca, las larvas sometidas a un fotoperiodo de luz roja, no mostraron ritmos circadianos evidentes en la expresión de este gen, obteniéndose resultados comparables a los de oscuridad y luz constantes. Estos resultados, son apoyados por estudios previos, donde se ha demostrado que la composición espectral de la luz utilizada afecta a la sincronización de ritmos de melatonina en lubina (Bayarri, 2002) y otros teleósteos (Oliveira et al., 2007), siendo la luz azul más eficaz en la sincronización de estos ritmos que la luz blanca, mientras que la luz roja no afecta a la concentración plasmática de melatonina nocturna. Este efecto, parece mediado por la sensibilidad diferencial de los pigmentos fotorreceptores, debida a la adaptación al ambiente fótico habitual, en el cual la luz roja es totalmente absorbida a pocos metros de la superficie, mientras la azul/violeta penetra mucho más (Wolken, 1995). Además, los fotorreceptores presentes en la pineal tienen la máxima sensibilidad a longitudes de onda cortas (azul) y medias (verde) (Forsell et al., 2001). Así pues, la luz roja puede utilizarse para la manipulación nocturna durante el manejo y muestreo sin afectar a los ritmos circadianos.

Estos resultados son consistentes con el hecho de que en la composición espectral de la luz también afecta a al crecimiento, supervivencia y desarrollo de larvas de lubina, de manera que la luz azul también mejora estos aspectos, mientras que la luz roja y las condiciones constantes de luz u oscuridad se asocian con malformaciones y alta tasa de mortalidad (Villamizar et al., 2009). Las alteraciones en el desarrollo larvario observadas por este autor podrían tener una relación con retraso en el desarrollo de los relojes moleculares descrito aquí, lo que sugeriría un papel regulador de los relojes moleculares en el desarrollo embrionario de teleósteos.

Varias hipótesis son compatibles con los resultados obtenidos. La expresión constitutiva/arrítmica de los genes reloj fue detectable en trucha y lubina durante los primeros días de desarrollo, y solo en los grupos sometidos a un fotoperiodo se detectó el comienzo de una expresión rítmica de estos genes al cabo de un periodo variable en función de la especie.

Este periodo sugiere que el efecto de la luz sobre la expresión de genes reloj requiere de cierto grado de diferenciación o desarrollo en las estructuras que componen los osciladores moleculares o los mecanismos de fotorrecepción. Una vez son funcionales, la luz puede actuar de dos formas, iniciando la oscilación circadiana, o bien sincronizando múltiples osciladores preexistentes (Vallone, 2007). Es decir, podrían existir ritmos a nivel celular asincrónicos no detectables por PCR, y la luz podría actuar sincronizando estos ritmos. Estudios recientes, apoyan esta última hipótesis ya que se han encontrado ritmos de expresión asincrónicos de *per1* a nivel celular en embriones de pez cebra durante primer día post-eclosión bajo DD, que son sincronizados por efecto de la luz (Dekens y Whitmore, 2008). Por último, el inicio de los ritmos manifiestos aparece más tarde en el desarrollo, posiblemente porque se requiere del desarrollo posterior o paralelo de diversas estructuras (glándulas, aparato locomotor, etc.) y del acoplamiento de éstas a los relojes moleculares.

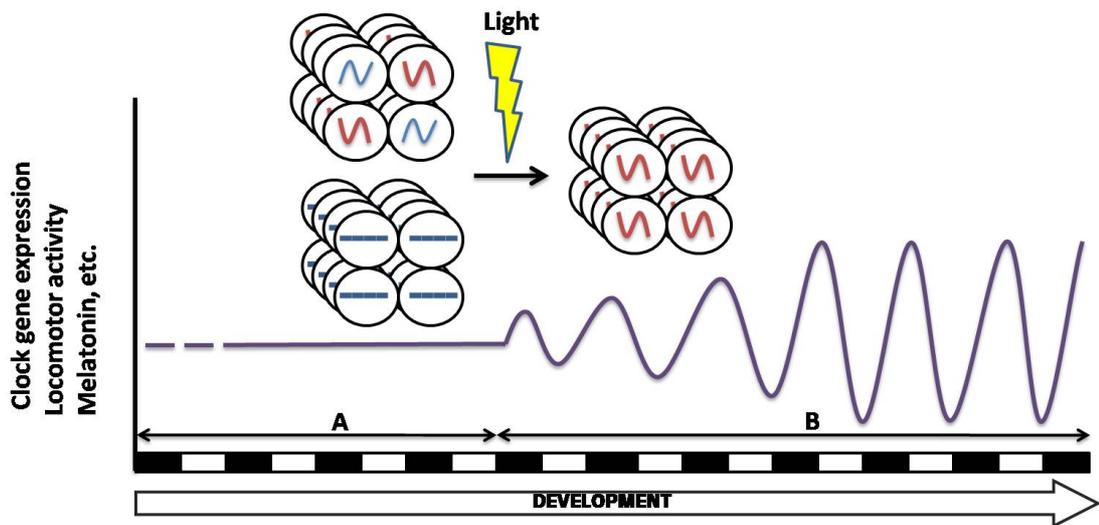


Figura 1. La expresión de los genes reloj comienza siendo arritmica (A). La luz es requerida para iniciar un ritmo en la expresión o bien, para sincronizar los ritmos de expresión celular asincrónicos (A->B). Este proceso puede ocurrir antes de la eclosión como la expresión *per1* en trucha arcoiris o bien posteriormente como en lubina y pez cebra. El momento del desarrollo en el que se detecta ritmicidad también varía en función del tipo ritmo (expresión de genes reloj, ritmos de melatonina, de comportamiento etc.), ya que se requiere cierto grado diferenciación.

Por último, es importante destacar que la función de los genes reloj en el desarrollo embrionario es poco conocida. Por un lado, como se ha mencionado anteriormente, la expresión arrítmica inicial se ha relacionado con funciones reguladoras del desarrollo embrionario separadas de los relojes moleculares. En *Xenopus*, por ejemplo, se ha encontrado una expresión diferencial de los genes reloj en distintos tejidos durante el desarrollo embrionario (Curran et al., 2008). Además, en otras especies se han descrito mutaciones letales de los genes reloj que provocan un desarrollo anormal que no llega a término (Vallone et al., 2007). Por otro lado, el significado biológico de la aparición de ritmos circadianos en etapas tempranas del desarrollo podría suponer una ventaja adaptativa, ya que los individuos adquieren la capacidad de anticiparse a eventos recurrentes muy poco después de la eclosión o incluso antes. Además, los relojes moleculares podrían regular procesos del desarrollo que deben ocurrir en orden temporal dado o en un momento concreto del día. Por ejemplo, en el pez cebra se han descrito ritmos de división celular a los 4 días post-fertilización y se ha postulado que permiten sincronizar la fase S de la mitosis a los momentos del día con menor radiación UV (Vallone et al., 2007), lo que disminuiría los daños mutagénicos.

En conclusión, los relojes moleculares están presentes y son funcionales durante el desarrollo embrionario de lubina y trucha arcoíris, detectándose ritmos circadianos en la expresión de genes reloj a partir del día 8 post-fertilización en trucha arcoíris, mientras que en lubina, los relojes están presentes en el 16 post-eclosión y a partir del día 5 post-eclosión, pueden detectarse ritmos circadianos de expresión de *per1* bajo condiciones lumínicas apropiadas. Estas diferencias son debidas probablemente a la diferente duración del desarrollo embrionario en estas especies. Además, nuestros resultados revelan que el inicio los ritmos circadianos en la expresión de los principales genes reloj es afectado tanto por el fotoperiodo, como por calidad de luz (longitud de onda o espectro).

## IV.II Sincronización a la luz y alimento.

Para profundizar en el estudio de la luz y del alimento como sincronizadores del sistema circadiano de teleósteos, se utilizaron dos modelos experimentales, el pez cebra y la dorada. El pez cebra ha sido muy utilizado en el estudio de los relojes moleculares, ya que presenta una serie de ventajas que lo hacen un modelo experimental excelente: pequeño tamaño, fácil mantenimiento en el laboratorio, alta fecundidad, un desarrollo rápido y además, su genoma está secuenciado, lo cual nos permitió investigar el efecto de estos sincronizadores sobre los relojes moleculares. Por otro lado, para el estudio del efecto del fotoperiodo y el horario de alimentación sobre los niveles de estrés y el crecimiento en teleósteos, se eligió como modelo a la dorada, ya el pez cebra es un modelo muy alejado de las especies de interés productivo y además, su pequeño tamaño hace difícil determinar niveles hormonales plasmáticos e incrementos de peso. Sin embargo, la dorada facilita estas determinaciones y es un modelo muy atractivo desde el punto de vista de la acuicultura y por lo tanto los resultados son más aplicables.

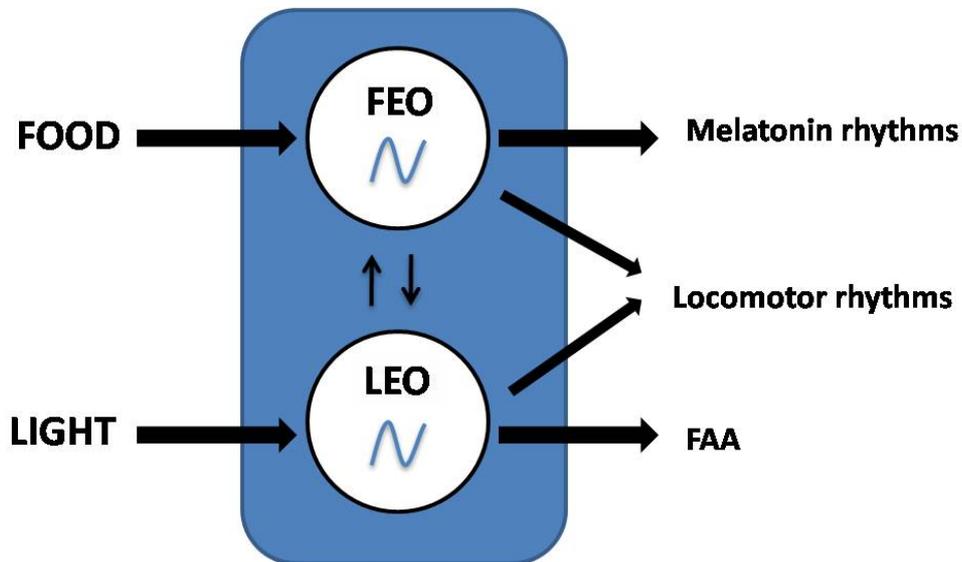
Los ritmos circadianos de actividad locomotora del pez cebra y los ritmos de alimentación de dorada han sido estudiados previamente (Hurd et al., 1998; Cahill, 2002; Velázquez et al., 2006). En nuestros experimentos, tanto las doradas, como los peces cebra mostraron un comportamiento diurno bajo un ciclo LD, confirmando los patrones de comportamiento diurnos atribuidos a ambas especies. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que el alimento también puede actuar como sincronizador de los ritmos biológicos, modulando los patrones de la actividad locomotora típicos de estas especies. Por ejemplo, en el pez cebra, los ciclos de alimentación periódica, provocaron un incremento en la actividad en la fase del día en la cual el alimento fue proporcionado (i.e., día o noche), lo cual, obviamente, está relacionado con la ingesta. Sin embargo, ambas especies continuaron mostrando la mayor parte de su actividad durante el día, tanto bajo un ciclo de alimentación periódica, como cuando fueron alimentadas aleatoriamente. Esta capacidad para modificar o modular los patrones de comportamiento normales, en este caso en respuesta a los ciclos de alimentación, ha sido observada frecuentemente en teleósteos (Sánchez-Vázquez y Madrid, 2001), y confirma la plasticidad del sistema circadiano atribuida a los teleósteos (Reeb y Lague, 2002), cuyo significado biológico es permitir una rápida adaptación a cambios ambientales.

La FAA ha sido descrita en un gran número de especies distintas, demostrándose que se trata de un ritmo circadiano endógeno, el cual se mantiene varios días después de la retirada del alimento. Nuestros experimentos realizados en el pez cebra demuestran, por primera vez, que esta especie también presenta FAA cuando es sometida a un ciclo de alimentación, de manera similar a lo que se ha descrito en otras especies de teleósteos (Aranda et al., 2001; Davidson, 2003; Sánchez-Vázquez et al., 1997; Stephan, 2002) y en mamíferos (Mistlberger, 1994). Resultados similares fueron encontrados en dorada, la cual también presentó FAA bajo alimentación periódica. Además, estudios recientes demuestran que la FAA no solamente implica un incremento en la actividad locomotora, sino que también implica cambios a nivel fisiológico y bioquímico, como el incremento en la secreción de amilasa y NPY dos horas antes de la hora de alimentación (Vera, 2007). Así pues, la FAA permite a los animales anticiparse al alimento, preparándose para su ingesta y optimizar la adquisición, digestión y utilización de éste.

La FAA es controlada por la existencia de un oscilador circadiano sincronizable por el alimento (FEO), tanto en mamíferos como en peces (Sánchez-Vázquez y Madrid, 2001). En mamíferos, mediante lesiones a nivel del núcleo supraquiasmático, se ha podido demostrar que el FEO está localizado fuera de esta estructura anatómica, ya que los animales lesionados siguen presentando FAA cuando son sometidos a alimentación periódica, a pesar de ser completamente arrítmicos. Por el contrario, el oscilador sincronizable por luz (LEO) de mamíferos, ha sido bien caracterizado y se ha localizado en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo. En el caso de teleósteos, no se ha descrito ninguna estructura anatómica concreta que actúe como FEO, ni como LEO, a pesar de que se ha demostrado la existencia de ambos osciladores mediante el análisis de los ritmos de actividad locomotora y de alimentación (Sánchez-Vázquez y Madrid, 2001).

Nuestros análisis de la expresión de los genes reloj *perl* y *cry1* en peces cebra sometidos a alimentación periódica bajo diferentes condiciones lumínicas, sugieren que el FEO está localizado fuera del cerebro, ya que los ciclos de alimentación no sincronizaron los ritmos de expresión de estos genes en cerebro. Sin embargo, estos resultados no permiten descartar que el FEO se encuentre en alguna estructura cerebral concreta, de manera que cambios en la expresión de los genes reloj en esta estructura queden enmascarados por la expresión global

obtenida en homogenados de cerebro. Así pues, hacen falta más estudios para determinar la localización anatómica del FEO y del LEO en peces.



*Figura 2. El LEO es sincronizado por la luz, mientras que el FEO es sincronizado por el alimento. Estos osciladores están relacionados entre sí y controlan diferentes ritmos de comportamiento y endocrinos. Por ejemplo, los ritmos de melatonina están bajo el control de LEO, mientras que la FAA está bajo el control de FEO. En general, los ritmos de actividad locomotora son controlados fundamentalmente por el LEO pero modulados por el FEO.*

La alimentación periódica, no solamente afecta a los patrones de comportamiento de los animales. Nuestros experimentos realizados en dorada demuestran, por primera vez, que el horario de alimentación (periódico vs. aleatorio) puede afectar tanto al crecimiento como al bienestar animal, aunque la cantidad de alimento total ingerido sea la misma. Los grupos de peces que fueron alimentados de forma periódica (en ML), mostraron un nivel de actividad locomotora menor, así como niveles menores de cortisol plasmático y glucosa. En contraposición, aquellos grupos que fueron alimentados de forma aleatoria mostraron una actividad locomotora global superior y unos niveles de cortisol plasmático 10 veces superiores a los encontrados en animales bajo alimentación periódica, siendo estos últimos similares a los descritos previamente en dorada (Sangiao-Alvarellos et al., 2005). Los niveles cortisol, glucosa y lactato plásmico en plasma han sido utilizados previamente como indicadores de estrés en

peces (Ashley, 2007). Además, estos metabolitos están estrechamente relacionados ya que el cortisol regula el metabolismo de carbohidratos e incrementa los valores plasmáticos de glucosa y lactato. En nuestros experimentos, los niveles de cortisol obtenidos en doradas alimentadas aleatoriamente fueron similares a los descritos para esta especie en condiciones estresantes (Laiz-Carrión et al., 2003; Polakof et al., 2006), lo que sugiere que los animales bajo un régimen de alimentación aleatoria, se mantienen bajo una alerta constante (ya que no pueden predecir la llegada del alimento) y están sometidos a una situación de estrés.

En las doradas bajo un régimen de alimentación periódico se observó un mayor crecimiento a los 30 días del experimento, aunque a los 60 días ambos grupos de animales (sometidos a alimentación aleatoria y periódica) mostraron un peso medio similar. Estos resultados sugieren que la alimentación periódica mejora el crecimiento, al menos a corto plazo. Este efecto podría estar mediado por la FAA que como se ha mencionado, permite optimizar la adquisición, digestión y utilización del alimento, o bien con el menor gasto energético en comparación con las doradas alimentadas aleatoriamente y sometidas a una situación de estrés, las cuales presentan un nivel de actividad motora mayor debido a que no pueden predecir cuando el alimento estará disponible.

En conjunto, estos hallazgos muestran la importancia del horario en la alimentación en teleósteos, de manera que los ciclos de alimentación periódica actúan como sincronizadores o moduladores de la actividad locomotora, mejoran el bienestar animal disminuyendo el estrés, e incluso podrían tener un efecto beneficioso sobre el crecimiento.

## **V. CONCLUSIONES.**



1. El gen reloj *per1* de lubina ha sido clonado y secuenciado, presentando una alta homología con los genes *per1* de pez cebra y medaka. Además, la proteína PER1 de lubina tiene los mismos dominios estructurales y funcionales identificados previamente en las proteínas “PERIODs” de vertebrados.
2. *Per1* se expresa en numerosos tejidos, tanto en tejidos neuronales, como en tejidos no nerviosos y muestra un patrón de expresión circadiano, con una acrofase o pico de expresión cercana al final de la noche.
3. La expresión del gen reloj *per1*, en larvas de lubina comienza en etapas tempranas del desarrollo, adquiriendo un patrón circadiano robusto a partir del día 16 post-eclosión bajo un ciclo LD.
4. El inicio de un patrón rítmico en la expresión de *per1* en larvas de lubina requiere de la presencia un ciclo luz/oscuridad durante el desarrollo, permaneciendo arrítmico bajo condiciones constantes de luz u oscuridad. La composición del espectral de la luz utilizada en el ciclo LD, también afecta al comienzo de la expresión rítmica de este gen. Utilizando luz azul, dicho ritmo es detectable a partir del día 5 post-eclosión (es decir, antes que con luz blanca), mientras que la luz roja no induce la expresión rítmica de *per1* durante los primeros 16 días post-eclosión.
5. El fotoperiodo afecta a la expresión de los genes reloj durante el desarrollo embrionario de la trucha arcoíris. Bajo un fotoperiodo 12L:12D, se detectó un patrón rítmico de expresión en los genes reloj (*per1* y *clock*) a partir del día 8 post-fertilización (dpf), mientras que la expresión rítmica de *aanat2* es detectable a partir del día 21dpf. Por el contrario, bajo condiciones constantes de luz, la expresión de los genes reloj es modificada, mostrándose arrítmica en el caso del gen *clock*, alterada en el caso de *per1*, o retrasada en el caso de *aanat2*

6. Los ritmos de expresión de genes reloj en trucha arcoíris, podrían iniciarse por fotorreceptores aún no identificados, ya que aparecen antes del desarrollo de los fotorreceptores clásicos (pineal y retina), y no se observan bajo condiciones constantes.
7. Los peces cebra sometidos a alimentación periódica muestran una actividad anticipatoria al alimento (FAA), que se manifiesta como un aumento de la actividad locomotora en las horas previas a la hora de alimentación.
8. En pez cebra, el oscilador sincronizado por el alimento parece localizarse fuera del cerebro. Sin embargo, no se puede descartar que esté localizado en una zona concreta del cerebro, cuya expresión rítmica quede enmascarada por la expresión global de estos genes en todo el cerebro.
9. La alimentación aleatoria afecta a los ritmos de comportamiento en dorada provocando un aumento de los niveles diarios de actividad locomotora, mientras que la alimentación periódica provoca un incremento de la actividad locomotora en las horas previas a la hora de la alimentación (FAA), mostrando un nivel de actividad diaria total menor.
10. En Dorada, la alimentación periódica mejora el bienestar animal y el crecimiento. Cuando los animales no pueden predecir la llegada del alimento aumentan los niveles de indicadores de estrés, como el cortisol y glucosa plasmáticos. Además, esta situación afecta al crecimiento, al menos a corto plazo.

## **VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.**



Akashi M., Tsuchiya Y., Yoshino T. and Nishida E. 2002 Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I epsilon (CKI epsilon) and CKI delta in cultured cells. *Mol. Cell Biol.* 22, 1693–1703.

Agostino PV, Plano SA, and Golombek DA. (2008) .Circadian and pharmacological regulation of casein kinase I in the hamster suprachiasmatic nucleus. *J. Genet.* 87: 467-471

Aschoff, J. 1981. Biological rhythms. En: J. Aschoff, ed. *Handbook of behavioral neurobiology*, Vol 4. New York. Plenum

Asturiano, J.F., Sorbera, L.A., Ramos, J., Kime, D.E., Carrillo, M., Zanuy, S. 2000. Hormonal regulation of the European sea bass reproductive cycle: an individualised female approach. *J. Fish Biol.* 56: 1155-1172.

Aranda A, Madrid JA, Sanchez-Vazquez FJ. (2001). Influence of light on feeding anticipatory activity in goldfish. *J. Biol. Rhythms* 16: 50-57.

Aschoff, J. (1960) Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol.* 25: 11-28.

Aschoff J (1986) Anticipation of a daily meal: A process of ‘learning’ due to entrainment. *Mon Zool Ital* 20:195-219.

Aschoff, J. 1981. Biological rhythms. En: J. Aschoff, ed. *Handbook of behavioral neurobiology*, Vol 4. New York. Plenum Press.

Ashley PJ. Fish welfare: current issues in aquaculture. *Appl Anim Behav Sci* 2007;104:199–235.

Beentjes, M.P.; William, B.G. 1986. Endogenous circatidal rhythmicity in the New Zealand cockle *Chitone stuchburyi* (Bivalvia, Veneridae). *Mar. Behav. Physiol.* 12: 171-180. *Bioessays.* 2002 May;24(5):419-26.

Blanco-Vives B, Sánchez-Vázquez FJ. 2009. Synchronisation to light and feeding time of circadian rhythms of spawning and locomotor activity in zebrafish. *Physiol Behav.* 7; 98(3):268-75.

Cahill GM. (2002). Clock mechanisms in zebrafish. *Cell Tissue Res.* 309: 27-34.

Castillo MR, Hochstetler KJ, Tavernier RJ, Jr., Greene DM, Bult-Ito A. (2004). Entrainment of the master circadian clock by scheduled feeding. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287: 551-555.

Carr AJ, Whitmore D. 2005. Imaging of single light-responsive clock cells reveals fluctuating free-running periods. *Nat Cell Biol* 7:319–321.

Cassone VM. 1998. Melatonin's role in vertebrate circadian rhythms. *Chronobiol Int.*5(5):457-73.

Cermakian N, Sassone-Corsi P. 2002. Environmental stimulus perception and control of circadian clocks. *Curr Opin Neurobiol.* 12(4):359-65

Cermakian N, Pando MP, Thompson CL, Pinchak AB, Selby CP, Gutierrez L, Wells DE, Cahill GM, Sancar A, Sassone-Corsi P. 2002. Light induction of a vertebrate clock gene involves signaling through blue-light receptors and MAP kinases. *Curr Biol* 12:844–848.

Comperatore CA, Stephan FK. Entrainment of duodenal activity to periodic feeding. *Journal of Biological Rhythms*, Vol. 2, No. 3, 227-242 (1987)

Curran KL, LaRue S, Bronson B, Solis J, Trow A, Sarver N, Zhu H. 2008. Circadian genes are expressed during early development in *Xenopus laevis*. *PloS one.* 3(7):e2749.

Danilova N, Krupnik VE, Sugden D, Zhdanova IV. 2004. Melatonin stimulates cell proliferation in zebrafish embryo and accelerates its development. *FASEB J* 18:751–753.

Davidson AJ, Poole AS, Yamazaki S, Menaker M. (2003). Is the food-entrainable circadian oscillator in the digestive system? *Genes Brain Behav.* 2: 32-39.

Delaunay F. An Inherited Functional Circadian Clock in Zebrafish Embryos. *Science.* 2000; 289(5477):297-300.

Dekens MP, Santoriello C, Vallone D, Grassi G, Whitmore D, and Foulkes NS. 2003. Light regulates the cell cycle in zebrafish. *Curr Biol* 13:2051–2057.

Dekens MP, Whitmore D. Autonomous onset of the circadian clock in the zebrafish embryo. 2008. *EMBO J.* 22; 27(20):2757-65.

Etchegaray JP, Lee C, Wade PA, Reppert SM. Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock. *Nature.* 2003 Jan 9; 421(6919):177-82.

Falcón J. 1999. Cellular circadian clocks in the pineal. *Prog Neurobiol.* 58(2):121-62.

Falcón J, Migaud H, Muñoz-Cueto JA, Carrillo M 2010. Current knowledge on the melatonin system in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology* 165: 469–482

Feldman JF, Hoyle MN. Isolation of circadian clock mutants of *Neurospora crassa*. *Genetics.* 1973 Dec; 75(4):605-13.

Forsell, J., Ekström, P., Flamarique, I.N., Holmqvist, B., 2001. Expression of pineal ultraviolet- and green-like opsins in the pineal organ and retina of teleosts. *J. Exp. Biol.* 204, 2517-2525.

Foulkes NS, Sassone-Corsi P. Molecular clocks (joint Juan March/EMBO workshop). Molecular clocks (joint Juan March/EMBO workshop). Madrid, May 10-12, 1999. EMBO J. 2000 Mar 1;19(5):789-91

Gall, G.A.E. y P.A. Crandell, 1992. "The rainbow trout". Aquaculture 100:1-10.

Gothilf Y, Coon SL, Toyama R, Chitnis A, Namboodiri MA, Klein DC. 1999. Zebrafish serotonin N-acetyltransferase-2: marker for development of pineal photoreceptors and circadian clock function. Endocrinology. 140(10):4895-903.

Gu YZ, Hogenesch JB, Bradfield CA. (2000). The PAS superfamily sensors of environmental and developmental signals. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 40: 519-561

Granato M, van Eeden FJ, Schach U, Trowe T, Brand M, Furutani-Seiki M, Haffter P, Hammerschmidt M, Heisenberg CP, Jiang YJ, Kane DA, Kelsh RN, Mullins MC, Odenthal J, Nüsslein-Volhard C. 1996. Genes controlling and mediating locomotion behavior of the zebrafish embryo and larva. Development. 123:399-413.

Halberg F (1960) Temporal coordination of physiologic function. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 25:289-310.

Hatziathanasion, A., M. Paspatis, M. Houbart, P.Kestemart, S. Stefanaki and M. Kentouri, 2002. Survival, growth and feeding in early life stages of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) intensively cultured under different stocking densities. Aquaculture, 205(1-2): 89-102.

Hurd MW, Cahill GM. 2002. Entraining signals initiate behavioral circadian rhythmicity in larval zebrafish. J Biol Rhythms 17:307–314.

Hurd MW, DeBruyne J, Straume M, Cahill GM. (1998). Circadian rhythms of locomotor activity in zebrafish. Physiol. Behav. 65: 465-472.

Kaneko M, Cahill GM. 2005. Light-dependent development of circadian gene expression in transgenic zebrafish. *PLoS Biol* 3:e34.

Kazimi N, Cahill GM. 1999. Development of a circadian melatonin rhythm in embryonic zebrafish. *Brain Res Dev Brain Res* 117:47–52.

Kelley, D.F. 1988. The importance of estuaries for sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *J. Fish Biol.* 33: 25-33.

Konopka RJ, Benzer S (1971) Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68:2112–2116

Lahiri K, Vallone D, Gondi SB, Santoriello C, Dickmeis T, Foulkes NS. (2005). Temperature regulates transcription in the zebrafish circadian clock. *PLoS. Biol.* 3: e351.

Láiz-Carrión R, Martín del Río MP, Míguez JM, Mancera JM, Soengas JL. Influence of cortisol on osmoregulation and energy metabolism in gilthead seabream *Sparus aurata*. *J Exp Zool* 2003; 298:105–18.

Lee C., Etchegaray J. P., Cagampang F. R., Loudon A. S. and Reppert S. M. 2001 Post-translational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell* 107, 855–867.

Lowrey P. L., Shimomura K., Antoch M. P., Yamazaki S., Zemenides P. D., Ralph M. R. et al. 2000 Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science* 288, 483–492.

Madrid, J.A.; Boujard, T.; Sánchez-Vázquez, F.J. 2001. Feeding rhythms. En: D. Houlihan; M. Jobling; T. Boujard, eds. *Food intake in fish*. Oxford. Blackwell Science Ltd.: 189-215.

Meijer JH, Rietveld WJ. Neurophysiology of the suprachiasmatic circadian pacemaker in rodents. *Physiol Rev.* 1989 Jul; 69(3):671-707.

Meissl H.; Nakamura, T.; Thiele, G. 1986. Neural response mechanisms in the photoreceptive pineal organ of goldfish. *Comp. Biochem. Physiol. A* 84: 467-473

Meissl, H.; Dodt, E. 1981. Comparative physiology of pineal photoreceptor organs. *Develop. Endocr.* 14: 61-80. 152

Mistlberger RE. Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev.* 1994; 18(2):171-95.

Moore-Ede MC, Sulzman FM, Fuller CA. (1982). *The clock that time us*. Harvard University Press. Cambridge, MA.

Moutsaki P, Whitmore D, Bellingham J, Sakamoto K, David-Gray ZK, Foster RG. 2003. Teleost multiple tissue (tmt) opsin: a candidate photopigment regulating the peripheral clocks of zebrafish? *Brain Res Mol Brain Res* 112:135–145.

Neuhauss SC, Seeliger MW, Schepp CP, Biehlmaier O. 2003. Retinal defects in the zebrafish bleached mutant. *Doc Ophthalmol.* 107(1):71-8.

Palmer, J.D. (1995). *The biological rhythms and clocks of intertidal animals*. New York. Oxford. University Press: 217 pp.

Oliveira, C., Ortega, A., López-Olmeda, J.F., Vera, L.M., Sánchez-Vázquez, F.J., 2007. Influence of constant light and darkness, light intensity and spectrum on plasma melatonin rhythms in Senegal sole. *Chronobiol. Int.* 24, 615-627.

Pando MP, Pinchak AB, Cermakian N, Sassone-Corsi P. A cell-based system that recapitulates the dynamic light-dependent regulation of the vertebrate clock. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Aug 28; 98(18):10178-83

Pando MP, Sassone-Corsi P. 2002. Unraveling the mechanisms of the vertebrate circadian clock: zebrafish may light the way. *Bioessays*. 2002; 24(5):419-26

Pittendrigh C (1960) Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 25:159-182.

Polakof S, Arjona FJ, Sangiao-Alvarellos S, Martín del Río MP, Mancera JM, Soengas JL. Food deprivation alters osmoregulatory and metabolic responses to salinity acclimation in gilthead sea bream *Sparus auratus*. *J Comp Physiol* 2006; 176:441–52.

Postlethwait JH, Woods IG, Ngo-Hazelett P, Yan YL, Kelly PD, Chu F, Huang H, Hill-Force A, Talbot WS. 2000. Zebrafish comparative genomics and the origins of vertebrate chromosomes. *Genome Res.* 10(12):1890–902.

Riva-Rossi, C., M.A. Pascual, J.A. Babaluk, M. Garcia-Asorey y N.M. Halden, 2007. "Intra-population variation in anadromy and reproductive life span in rainbow trout introduced in the Santa Cruz River, Argentina". *J. Fish. Biol.* 70:1780-1797.

Reebs SG, Lague M. (2000). Daily food-anticipatory activity in golden shiners. A test of endogenous timing mechanisms. *Physiol. Behav.* 70: 35-43.

Rietveld, W.J. 1992. The circadian network are feedback loops to the circadian oscillator of any functional importance to its control function. *J. Interd. Cycle Res.* 23: 140-142.

Rønnestad, I., W. Koven, A. Tandler, M. Harel and H.J. Fyhn. 1998. Utilisation of yolk fuels in developing eggs and larvae of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*. 162: 157-170

Sánchez-Vázquez FJ, Azzaydi M, Martínez FJ, Zamora S, Madrid JA. Annual rhythms of demand-feeding activity in sea bass: evidence of a seasonal phase inversion of the diel feeding pattern. *Genome Res.* 2000 Dec; 10(12):1890-902.

Sanchez-Vazquez FJ, Madrid JA, Zamora S, Tabata M. (1997). Feeding entrainment of locomotor activity rhythms in the goldfish is mediated by a feeding-entrainable circadian oscillator. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural Behav.* 451 Physiol. 181: 121-132.

Sánchez-Vázquez FJ, Madrid JA, Zamora S. Circadian rhythms of feeding activity in sea bass, *Dicentrarchus labrax* L.: dual phasing capacity of diel demand-feeding pattern. *J Biol Rhythms.* 1995 Sep; 10(3):256-66.

Sanchez-Vazquez FJ, Madrid JA. (2001). Feeding Anticipatory Activity. *Food Intake in Fish.* Blackwell Science Ltd, pp. 216-232.

Sangiao-Alvarellos S, Guzmán JM, Láiz-Carrión R, Míguez JM, Martín del Río MP, Mancera JM, et al. Interactive effects of high stocking density and food deprivation on carbohydrate metabolism in several tissues of gilthead sea bream *Sparus auratus*. *J Exp Zool* 2005; 303:761–5.

Seron-ferre M, Valenzuela GJ, Torres-farfan C. Circadian Clocks During Embryonic and Fetal Development. 2007; 214(Part C):204-214.

Shearman LP, Zylka MJ, Reppert SM, Weaver DR. Expression of basic helix-loop-helix/PAS genes in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience.* 1999 Mar;89(2):387-97.

Stephan FK. (2002). The "other" circadian system: food as a Zeitgeber. *J. Biol. Rhythms* 17: 284-292.

Stephan FK. The "other" circadian system: food as a Zeitgeber. *J Biol Rhythms.* 2002 Aug; 17(4):284-92.

Stephan, F.K.; Swann, J.M.; Sisk, C.L. 1979a. Entrainment of circadian rhythms by feeding schedules in rats with suprachiasmatic nucleus lesions. *Behav. Neural. Biol.* 25: 545-554.

Stephan, F.K.; Swann, J.M.; Sisk, C.L. 1979b. Anticipation of 24h feeding schedules in rats with lesions of the suprachiasmatic nucleus. *Behav. Neurol. Biol.* 25: 346-363.

Storch, K.F., Lipan, O., Leykin, I., Viswanathan, N., Davis, F.C., Wong, W.H. and Weitz, C.J. (2002) Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature*, 417, 78–83.

Sumová A, Bendová Z, Sládek M, El-Hennamy R, Matejů K, Polidarová L, Sosniyenko S, Illnerová H. Circadian molecular clocks tick along ontogenesis. *Physiol Res.* 2008; 57 Suppl 3:S139-48.

Tamai TK, Carr AJ, and D. Whitmore. Zebrafish circadian clocks: cells that see light 3. *Biochem.Soc.Trans.* 33 (Pt 5):962-966, 2005.

Tei H, Okamura H, Shigeyoshi Y, Fukuhara C, Ozawa R, Hirose M, Sakaki Y. (1997). Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila* period gene. *Nature* 389: 512-516

Vallone D, Lahiri K, Dickmeis T, Foulkes NS. Start the clock! Circadian rhythms and development. 2007. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*; 236(1):142-55.

Velarde E, Haque R, Iuvone PM, Azpeleta C,onso-Gomez AL, Delgado MJ. (2009). Circadian clock genes of goldfish, *Carassius auratus* cDNA cloning and rhythmic expression of period and cryptochrome transcripts in retina, liver, and gut. *J. Biol. Rhythms* 24: 104-113.

Velázquez M., Zamora S. and Martínez F.J. (2004). Influence of environmental conditions on demand-feeding behaviour of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Journal of Applied Ichthyology*, 20:6, 536 - 541

Velázquez M, Zamora S, Martínez FJ. Effect of dietary energy content on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) feeding behaviour and nutritional use of the diet. *Aquac Nutr* 2006; 12:127–33.

Vera LM, De PN, Gomez-Milan E, Delgado MJ, Sanchez-Muros MJ, Madrid JA, Sanchez-Vazquez FJ. (2007). Feeding entrainment of locomotor activity rhythms, digestive enzymes and neuroendocrine factors in goldfish. *Physiol. Behav.* 90: 518-524.

Vielhaber EL, Duricka D, Ullman KS, Virshup DM. (2001). Nuclear export of mammalian PERIOD proteins. *J. Biol. Chem.* 276: 45921-45927

Wang H. Comparative analysis of period genes in teleost fish genomes. *J Mol Evol.* 2008 Jul; 67(1):29-40.

Wang H. Comparative genomic analysis of teleost fish *bmal* genes. *Genetica.* 2009 May; 136(1):149-61.

Whitmore D, Foulkes NS, Strahle U, Sassone-Corsi P. (1998). Zebrafish Clock rhythmic expression reveals independent peripheral circadian oscillators. *Nat. Neurosci.* 1: 701-707.

Whitmore D, Foulkes NS, Sassone-Corsi P. 2000. Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. *Nature.* 87-91.

Wolken, J.J., 1995. The physical nature of light: the interaction of light with matter and molecules of life. In: Wolken, J.J. (Ed.), *Light detectors, photoreceptors, and imaging systems in nature.* Oxford University Press, New York, pp. 6-16.

Yoo SH, Yamazaki S, Lowrey PL, Shimomura K, Ko CH, Buhr ED, Slepka SM, Hong HK, Oh WJ, Yoo OJ, Menaker M, Takahashi JS. (2004). PERIOD2 LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 5339-5346.

Young MW. (1998). The molecular control of circadian behavioral rhythms and their entrainment in *Drosophila*. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 135-152

Young MW, Kay SA. Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. *Nat. Rev. Genet.* 2001; 2:702-715.

Ziv L, Gothilf Y. 2006. Circadian time-keeping during early stages of development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 103 (11):4146-51.



## **VII. GLOSARIO**



**AANAT.-** enzima arilalkilamina-N-acetiltransferasa. Cataliza el paso de N-acetilserotonina a melatonina en la síntesis de ésta última. Generalmente es la enzima limitante de esta ruta metabólica.

**Acrofase.-** (del gr. *ἄκρος*, en lo más alto + *φάσις*, manifestación), punto u hora del día de una onda media o función sinusoidal cuyo valor es máximo, opuesto a la batifase o punto de mínimo valor.

**Actograma.-** representación gráfica que muestra la expresión de una variable a lo largo de 24 horas, durante varios días.

**Amplitud.-** es la diferencia entre los valores máximo y mínimo de la onda media o función sinusoidal.

**ANOVA.-** análisis de la varianza. Test estadístico.

**°C.-** grados centígrados.

**°C-día.-** grados-día. Resultado de multiplicar la temperatura en grados centígrados por los días (horas o minutos) transcurridos. Tradicionalmente usado en el estudio del desarrollo embrionario de salmónidos, en contraposición con “horas post- fertilización”.

**Ciclo.-** (del gr. *κύκλος*, círculo), es la menor distancia a partir de la cual una onda periódica se repite.

**Circadiano.-** (del lat. *circa*, alrededor de, cerca + *dies*, día), alrededor de un día.

**CKI.-** Casein Kinasa I. Encima que cataliza la fosforilación de proteínas en secuencias específicas. Existen varias isoformas CKI1ε, CKI1α, etc.

**COR.-** cortisol, hormona esteroide comúnmente utilizada como indicador de estrés. Moviliza energía (ya que libera glucosa), para que el organismo pueda satisfacer su mayor demanda metabólica en condiciones de estrés.

**Cronobiología.-** (del gr. *χρόνος*, tiempo + *βίος*, vida + *λογία*, ciencia), ciencia que estudia los ritmos biológicos.

**Curso libre o free-running.-** condiciones en las que, en ausencia de sincronizadores externos, el marcapasos circadiano oscila con periodo endógeno o *tau* próximo a 24h, haciendo que el animal muestre unos ritmos de actividad de duración igual al periodo endógeno.

**DD.-** (del ingl. Dark/Dark) condiciones de oscuridad constante.

**Día subjetivo.-** fase del ritmo endógeno en la que el organismo, cuando se encuentra en curso libre o condiciones ambientales constantes, se comporta como si fuese de día.

**Diurno.-** dicese del individuo o especie que es activo durante la fase de luz del fotoperiodo.

**Dual.-** individuo o especie genéticamente capaz de desarrollar su actividad diaria indistintamente durante la fase de oscuridad, o de luz. Algunas especies pueden llevar a cabo inversiones de fase a lo largo de su ciclo de vida, de nocturno a diurno y viceversa.

**E-box.-** Caja E. Secuencia de DNA cuya secuencia consenso es CACGTG. Está presente en los promotores de genes reloj y genes *clock*-regulados.

**Encarrilamiento.-** acoplamiento del ritmo endógeno a un ritmo ambiental.

**Endógeno.-** (del gr. *ἔνδον*, dentro + *γεννάω*, generar, producir), intrínseco al organismo, que se origina por causas internas. Cuando se habla de ritmo endógeno, se refiere al ritmo que desarrolla un sujeto en ausencia de información ambiental externa, debido a mecanismos internos.

**Enmascaramiento.-** modificación de la expresión del ritmo de un organismo, debido a un factor ambiental que no actúa sobre el marcapasos circadiano.

**Escotofase.-** (del gr. *σκότος*, tiniebla + *φάσις*, manifestación), noche o fase de oscuridad del fotoperiodo.

**Exógeno.-** (del gr. *ἔξω*, dentro + *γεννάω*, generar, producir), que se debe a causas externas.

**FAA.-** (del ingl. *feeding* + *anticipatory* + *activity*), se refiere a la actividad anticipatoria previa al horario regular de alimentación, que un animal desarrolla debido a mecanismos endógenos.

**Factor enmascarante.-** estímulo rítmico ambiental que influye directamente sobre la expresión del ritmo circadiano del organismo, pero sin actuar sobre su marcapasos circadiano.

**FEO.-** (del ingl. *feeding* + *entrainable* + *oscillator*), se refiere al oscilador que es encarrilado por el alimento.

**Fotofase.-** (del gr. *φως*, luz + *φάσις*, manifestación), fase de luz del fotoperiodo, contraria a la escotofase.

**Free-running.-** (del ing.). Véase curso libre.

**GADPH.-** Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa. Enzima citoplasmática que participa en la glucólisis. Cataliza la oxidación de Gliceraldehido-3-P a 1-3 bisfosfoglicerato. Suele ser expresada constitutivamente y es muy utilizada para la normalización de datos de expresión génica.

**HLH- (*Helix-loop-helix*).** Dominio estructural presente en ciertas proteínas, generalmente factores de transcripción. Participa en la unión al DNA.

**HPE.-** Horas post-eclosión. Define el tiempo transcurrido desde la eclosión del huevo.

**HPF.-** Horas post-fertilización. Define el tiempo transcurrido desde la fertilización del huevo.

**LD.-** (del ingl. *Light/Dark*), se refiere a las fases del fotoperiodo, de luz y oscuridad. LD 12:12, indica las 24 h del día quedan divididas en 12 horas de luz y 12 de oscuridad.

**LEO.-** (del ingl. *light + entrainable + oscillator*), se refiere al oscilador que es encarrilado por la luz.

**LL.-** (del ingl. *Light/Light*), condiciones de luz constante.

**Marcapasos circadiano.-** estructura endógena generadora de ritmos diarios.

**Masking.-** Enmascaramiento. Modificación o alteración de la fase de un ritmo circadiano por efecto de un factor ambiental biótico o abiótico, sin ejercer un efecto sincronizador sobre reloj biológico que regula dicho ritmo circadiano.

**NES.-** (del inglés, *nuclear export signal*). Dominio proteico que actúa como secuencia señal de localización nuclear.

**Multioscilariorio.-** hace referencia al sistema circadiano compuesto por varios osciladores o relojes circadianos, relacionados entre sí para dar lugar a la expresión del ritmo.

**Noche subjetiva.-** fase del ritmo endógeno en el cual, un animal que se encuentra en curso libre, se comporta como si fuese de noche.

**Nocturno.-** dicese del individuo o especie que es activo durante la fase de oscuridad del fotoperiodo.

**NSQ.-** núcleo supraquiasmático (también SCN, en inglés), estructura localizada en el hipotálamo, en la que se localiza el marcapasos central en mamíferos.

**Onda media.-** análisis del ritmo de la fase de actividad y reposo media de todos los animales estudiados durante varios días.

**Oscilador circadiano.-** estructura interna del organismo capaz de generar ritmos.

**PAS.-** (Per + Arnt + Sim). Dominio conservado presente en algunas proteínas que constituyen la familia de proteínas PAS. Actúa como sitio de unión, interviniendo en la interacción y formación de dímeros en dominios PAS de diferentes proteínas.

**Periodo.-** el intervalo de tiempo necesario para completar un ciclo repetitivo.

**Periodo endógeno.-** también llamado *tau*, se representa por la letra griega  $\tau$  e indica la duración del ciclo del marcapasos circadiano de un individuo o especie, se manifiesta cuando no está sujeto a sincronizadores externos.

**Periodograma.-** representación gráfica de los posibles periodos de un ritmo explicados por el porcentaje de variación entre sus datos, de la que se obtiene el periodo endógeno de un sujeto.

**RF.-** (*Random feeding*). Alimentación aleatoria, es decir la hora de alimentación varía aleatoriamente cada día.

**RIA.-** radioinmunoensayo. Técnica empleada para cuantificar la concentración de una sustancia en un medio. Para ello, se une un isótopo radiactivo al anticuerpo, siendo posible la cuantificación del complejo antígeno-anticuerpo a través de la radiactividad emitida.

**Ritmo circadiano.-** ritmo endógeno automantenido de aproximadamente 24h.

**S.E.M.-** error estándar de la media.

**SF.-** (*scheduled feeding*).- alimentación periódica, es decir alimentación diaria a una hora concreta e invariable del día.

**Sincronización.-** acoplamiento del ritmo del animal con un estímulo rítmico ambiental. Al contrario que el encarrilamiento, no implica la intervención del componente endógeno. Esto es, la sincronización también se puede producir por factores enmascarantes.

**Sincronizador.-** también llamado *zeitgeber*, factor ambiental capaz de actuar sobre el marcapasos circadiano de un organismo, encarrilando su ritmo biológico.

**S/M.-** (del inglés, *short-mutable*). Dominio o región presente en ciertas proteínas como las proteínas de la familia PERIOD.

**Tau ( $\tau$ )-** véase periodo endógeno.

**TRH.-** Tracto retinohipotalámico. Vías nerviosas que comunican la retina con el hipotálamo.

**Zeitgeber.-** término que proviene del alemán y significa “dador de tiempo”. Véase sincronizador.

**ZT.-** (del inglés, *Zeitgeber time*). Hace referencia al tiempo circadiano o fisiológico de un animal. Para un animal diurno ZT0 indica la hora de encendido de las luces, mientras que para un nocturno ZT0 indica la hora de apagado de las luces.

## **VIII. ANEXOS**



## 1. PRODUCCION CIENTIFICA.

La presente Tesis Doctoral ha dado lugar a la siguiente producción científica:

### 1.1 Publicaciones:

Sánchez JA, Madrid JA, Sánchez-Vázquez FJ. Molecular cloning, tissue distribution, and daily rhythms of expression of *perl* gene in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Chronobiol Int.* 2010 Jan;27(1):19-33.

Sanchez JA, Sanchez-Vazquez FJ. Feeding entrainment of daily rhythms of locomotor activity and clock gene expression in zebrafish brain. *Chronobiol Int.* 2009 Aug;26(6):1120-35.

Sánchez JA, López-Olmeda JF, Blanco-Vives B, Sánchez-Vázquez FJ. Effects of feeding schedule on locomotor activity rhythms and stress response in sea bream. *Physiol Behav.* 2009 Aug 4;98(1-2):125-9. Epub 2009 May 3.

### 1.2 Comunicaciones a Congresos:

J.A. Sánchez-Férez, J.A. Madrid, F.J. Sánchez-Vázquez. Influencia del ciclo de alimentación sobre los ritmos diarios de actividad motora y expresión de genes reloj en pez cebra (*Danio rerio* Hamilton, 1822). Póster. XI congreso nacional de acuicultura. Vigo (Spain). 2007

F. Lopez- Olmeda, J.A. Sánchez-Férez, J.A. Madrid, B. Blanco-Vives, F.J. Sánchez-Vázquez. Horario de alimentación y bienestar animal: comidas periódicas frente aleatorias en la dorada (*Sparus aurata*). XI congreso nacional de acuicultura. Vigo (Spain) .2007

Autores: J.F. Lopez- Olmeda, J.A. Sánchez-Férez, J.A. Madrid, B. Blanco-Vives, F.J. Sánchez-Vázquez. Efecto del ciclo de alimentación (periódica frente aleatoria) en el cortisol plasmático y metabolitos plasmáticos indicadores del estrés en la dorada (*Sparus aurata*). Póster. VI congreso de la asociación ibérica de endocrinología comparada. Cádiz, 2007

A.Davie, J.A. Sanchez J.A., L.M. Vera, F.J. Sanchez-Vazquez. Ontogeny of clock mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during early developmental stages. Póster. 5TH FISH & SHELLFISH LARVICULTURE SYMPOSIUM. : Belgium. 2008

J.A. Sánchez y F.J. Sánchez-Vazquez. Influencia de los ciclos de alimentación en la expresión de genes reloj en cerebro de teleósteos. XIII Congreso Nacional de Acuicultura. Póster. Madrid, 2009.

J.A. Sánchez Férez, F.J. Sánchez Vázquez. Expresión de *per1* en lubina (*Dicentrarchus labrax*). XIII Congreso Nacional de Acuicultura. Póster. Madrid, 2009

J.A. Sánchez, A. Del Pozo y F.J. Sánchez-Vazquez. Clonación y distribución de la expresión de dos cryptocromos de lubina Europea. XIII Congreso Nacional de Acuicultura. Póster. Madrid, 2009

Sánchez J.A. The clock genes: Molecular cloning and characterization. VIII Congreso de la sociedad española de biología celular. (Comunicación oral). Diciembre, 2009, Murcia

## **2. BECAS Y CONTRATOS DE INVESTIGACIÓN.**

2.1. Beca de Postgrado para la Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación y Ciencia. Convocatoria 2004. Duración 4 años.

2.2. Contrato de trabajo en prácticas con la Universidad de Murcia a través del programa FPU del Ministerio de Educación y Ciencia. Duración: 2 años.

Esta beca/contrato incluye la colaboración en tareas docentes. “*venia docendi*” del programa FPU del Ministerio de Educación y Ciencia. 120 horas. 2006-09.

### 3. ESTANCIAS BREVES.

Estancia breve dentro del programa FPU del Ministerio de Educación y Ciencia: Institute of Aquaculture, University of Stirling. Escocia. Junio-Septiembre 2008.

### 4. PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN.

La presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo asociada a los siguientes proyectos de investigación:

1. “Mecanismos implicados en las inversiones nocturnas/diurnas de comportamiento de la lubina (*Dicentrarchus labrax*, L.)” AGL2004-07984-C02- 01/ACU. Dr Juan Antonio Madrid Pérez, Dr. Francisco Javier Sánchez Vázquez.
2. “Ritmos diarios de puesta en peces: ¿la hora del día es importante en la reproducción?” Fundación SENECA (05690/PI/07) 2007-2008.: Dr. F.J. Sánchez Vázquez
3. “Influencia del ciclo de luz, temperatura y alimentación en el desarrollo del sistema circadiano: implicaciones en el establecimiento de ritmos de actividad alimentaria y reproducción en peces.” MEC (AGL2007-66507-C02-02) 2008-2010. Dr. F.J. Sánchez Vázquez
4. “Ontogenia del reloj biológico de la lubina: papel sincronizador de la luz durante el desarrollo temprano e impacto sobre los ritmos de alimentación diurnos/nocturnos” Organización Financiera: Fundación SENECA (08743/PI/08). 2009-2010.
5. “Aquagenomics: mejora de la producción en acuicultura mediante herramientas de biotecnología” MEC (Programa Consolider-Ingenio 2010, proy. Nº 28502) 2007-2012. Coordinador: Dr. A. Figueras



## **VII. RESUMEN EN INGLÉS**



# SUMMARY

## INTRODUCTION

Chronobiology is a field of science that studies time-related phenomena in living organisms. Basically, chronobiology studies the biological rhythms and the origin and alterations of these rhythms. In recent years, this field of science has repeatedly demonstrated the importance of the circadian system in the adaptation of living organisms to their environment. Biological rhythms can be defined as a biological phenomenon (physiological or behavioural) that oscillates with a characteristic period, repeating itself at regular intervals of time (Aschoff, 1981). The most studied biological rhythms, and probably the most important, are the circadian rhythms (from the Latin *circa*, close; *Diem*, day), which are examined in this thesis. These rhythms have a period close to 24 hours and they are related with the day/night cycle.

The circadian system of animals consists of one or more oscillators or circadian clocks, which presents an endogenous and autonomous rhythmicity, some input autonomous pathways which transmit the data of the environmental cycles, that synchronizing the oscillators, and some output pathways which transmit the temporal information from the oscillators to the whole body, giving rise to the expression of physiological and behavioural rhythms. The environmental factors that synchronize biological clocks are called synchronizers or zeitgebers, and these allow biochemical, physiological and behavioural rhythms to be kept in phase with environmental cycles. In mammals (the most studied organisms), the master circadian clock is located in the suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus. This circadian clock is synchronized to the cycle of light / dark by afferent projections of the retina. The photoperiod is one of the most studied zeitgebers, but in recent years the existence of the other important synchronizers have been demonstrated, such as food cycles and thermocyclers.

The circadian system is managed by molecular clocks. Basically, molecular clocks consist of a series of clock genes and their products. Clock gene expression is a self-sustained

oscillation controlled by a positive and negative feedback mechanisms, where the gene products inhibit or activate the transcription of other clock genes.

Both the molecular clock ontogeny and the maturation of the circadian system are relatively unknown. In mammals, it has been demonstrated that maternal synchronizing signals, such as melatonin rhythms, play an important role in the development of biological clocks and circadian system. Interestingly, it has also been shown that the expression of major clock genes begins even before fertilization (Delaunay et al., 2000; Seron-Ferre et al., 2007). In zebrafish, however, environmental signals, such as photoperiod, have been shown to be essential for the initiation of the rhythmic expression of the clock genes, and for the synchronization of cellular rhythms (Carr and Whitmore, 2005).

Generally, the teleost circadian system is less well known than the mammal equivalent. However, study of the biological rhythms of teleosts is very important both for basic research and for aquaculture production. The zebrafish circadian system has been the most studied in teleosts, and this species has been used as a model to study the molecular clocks and the circadian system of vertebrates. However, the results cannot always be extrapolated to aquaculture species because of the great diversity of teleost species.

## **AIMS**

The overall aim of the present doctoral thesis is the study of the molecular clock mechanisms in teleosts, and their synchronization to the daily cycles of photoperiod and feeding. The specific aims are:

1. To clone the clock gene, *per1*, in European sea bass, studying the distribution of the expression of this gene and to analyze its expression along 24 hours, in the nervous and peripheral tissues.
2. To study the effect of the photoperiod and the different wavelengths of the light spectrum on the initiation of rhythmic expression of *per1* gene in sea bass larvae (from 0-5 days post-fertilization).

3. To study molecular clocks ontogeny during early embryonic development, in rainbow trout embryos, a model with a long incubation period, exposed to different photoperiods.

4. To determine the synchronizer effect of feeding cycles on clock gene expression and locomotor activity rhythms in zebrafish.

5. To study the effect of periodic (vs. random) feeding on the behavioural rhythms, biomass increase and some stress indicators in sea bream.

## **METHODS**

### **1. Animals and housing Conditions.**

Animals were kept in aquaria (zebrafish) or tanks with a constant temperature. Illumination was provided by full spectrum fluorescent tubes (GRO-LUX, 40 W, Germany) with photoperiod generally set at 12:12 LD cycle. Food was provided manually or by an automatic timer-feeder (EHEIM, model 3581, Germany). Feeders for random-fed fish were coupled to a timer (Data Micro, Orbis, Spain), and random feeding times were programmed, setting the feeding interval between 12 and 36 h, so that on average all fish received the same amount of food per 24 h.

Fish were sampled during the course of one day every 3-4 h to study daily rhythms of expression and hormone levels. Sampling was carried out under the same lighting conditions as fish has been held until that moment, using a dim red light to sample during darkness. The tissue samples were stored at -80°C in TRIzol (Invitrogen) until real time PCR analysis.

### **2. Cloning of sea bass *per1* gene and sequence analysis**

Rapid amplification of cDNA ends (RACE) was carried out using the SMART RACE cDNA amplification kit (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA). The per specific primers and nested primers for 3' and 5'-RACE were designed on the basis of the sequence of partial cDNA fragments obtained by degenerate primers. The cDNA fragments amplified by RACE were cloned in TOPO-TA vector (Invitrogen) and then sequenced. cDNA sequence and

deduced amino acid sequence were analyzed and compared to their counterpart sequences available in GenBank using the BLAST program. The protein domain was predicted with the simple modular architecture research tool program version 4.0 (SMART) (Schultz et al., 1998; Letunic et al., 2006) and ScanProsite. Multiple alignments with other PER proteins were carried out using the ClustalW2 program (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) with the following settings: gap open penalty=10, gap extension penalty=0.05, gap distance=8. The phylogeny inference package software, PHYLIP 3.68 (Felsenstein, 1989) was used to perform the remaining analyses.

### **3. Activity rhythms analysis.**

Locomotor activity rhythms were registered by means of an infrared photocell (Omron, 3S-AD62, Japan; wavelength = 880 nm) placed in each aquarium and tank. Photocells were connected to a computer, so that every time a fish interrupted the infrared light beam it produced an output signal. The number of light beam interruptions was stored every 10 min by a computer using laboratory-developed software for data acquisition.

### **4. Real time polymerase chain reaction (PCR)**

The samples were homogenized in TRIzol® using a tissue homogenizer (POLYTRON®, PT1200, Kinematica, Switzerland) and processed using PureLink Micro-to-Midi Systems (Invitrogen) and TRIzol (Invitrogen). Total RNA concentration was determined, and 1 µg was treated with DNase I amplification grade (1 unit/µg RNA, Invitrogen) to prevent genomic DNA contamination. cDNA synthesis was performed with Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) and Oligo (dT)18 or random primers (Invitrogen) in a 20 µl reaction volume. Real-time PCR was performed using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and an ABI Prism 7500 apparatus (Applied Biosystems). The ABI Sequence Detection System 7000 software (Applied Biosystems) was programmed to perform the following protocol: 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. All samples were run in triplicate. The primers for all genes were designed with Primer

Express Software (Applied Biosystems) and synthesized by Invitrogen. The amplification efficiency, specificity of primers, and amount of cDNA per sample were tested by the standard-curve method. The relative expression was calculated using a reference gene by the CT method with efficiency correction, or by the absolute quantification method.

## **5. Cortisol, glucose, and lactate analysis**

Plasma cortisol levels were measured using a commercial radioimmunoassay kit (Demeditec Diagnostics GMBH, Germany), lactate was estimated using a colorimetric kit (Spinreact, Barcelona), and glucose values were determined by a glucometer (GLUCOCARD Gmeter, Menarini Laboratories, Barcelona). The sensitivity of the cortisol assay (according to the manufacturer) was 0.07 µg/dl, determined at -2 S.D. from Bo (n=20). The intra-assay coefficient of variation calculated using sea bream samples was 9.1%, which is close to the value given by the manufacturer (7.7%).

## **6. Data analysis.**

Locomotor activity data were analyzed by chronobiology software (EL TEMPS® by Prof. A. Díez Noguera, University of Barcelona), Excel, and SPSS. Statistical analyses of gene relative expression were accomplished by factorial ANOVA. Cosinor analysis was performed using the chronobiology software “EL TEMPS®” (by Prof. A. Díez Noguera, University of Barcelona). This analysis evaluates whether a set of data has a regular fluctuation with a defined period (24h) by fitting a cosine curve with the period to the data (Nelson et al., 1979). We considered the rhythms significant when  $p < 0.05$ .

# **RESULTS AND DISCUSSION**

## **1. THE MOLECULAR CLOCKS AND THEIR ONTOGENY.**

### **1.1 Molecular cloning of *per1* gene in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)**

Circadian rhythms are controlled by interlocked autoregulatory feedback loops consisting of interactions of a group of circadian clock genes and their proteins. The Period family is a group

of genes that are essential components of the molecular clock. In the present study, we have cloned a period gene (*per1*) of the European sea bass, a marine teleost of chronobiological interest. The cloned sequence encoded a protein consisting of 1436 amino acids which homology and phylogenetic analyses showed to be related with fish PER1 proteins and to have a very high degree of identity with *Oryzias latipes* (Medaka) *per1*. Polymerase chain reaction screening of *per1* expression showed this gene is expressed in all the tissues analyzed (brain, heart, liver, gill, muscle, digestive tract, adipose tissue, spleen and retina). In addition, a daily expression rhythm, with an acrophase (peak time)  $\sim$ ZT0 (lights-on), was found in the two tissue types investigated - neural (brain) and peripheral (liver and heart). In conclusion, identification and characterization of the gene encoding sea bass *per1* provide valuable information for understanding the circadian mechanism at the molecular level in this species, although further research is needed to clarify the exact role *per1* plays in the circadian oscillator and the dual behaviour of European sea bass.

### **1.2 Ontogeny of circadian clock in sea bass larvae.**

Clock gene expression begins very early in teleost embryo development. However, the establishment of a rhythmic pattern in the expression of clock genes is affected by lighting conditions. In the present study, we investigate the effect of the light spectrum and photoperiod on the expression of *per1* in sea bass larvae during the early stages of embryonic development. Five experimental groups of sea bass larvae were subjected to different light conditions. The first group was kept under constant light (LL) and the second group was kept under constant darkness (DD). The other groups were subjected to a 12L: 12D photoperiod with different wavelengths: white (LDW), red (LDR) and blue (LDB). The larvae of the LDB and LDW groups showed a circadian pattern of *per1* expression on days 5 and 16 post-incubation, although on day 5 the rhythm of expression showed low amplitude. However, *per1* expression in larvae exposed to constant conditions (LL or DD) was arrhythmic, as it was in the LDR group. These results show the importance of lighting conditions (photoperiod and wavelength) in the ontogeny of biological clocks in the sea bass.

### **1.3 Ontogeny of molecular clocks in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in early stages of development.**

Molecular clock controls all the biological rhythms of organisms. In teleosts, molecular clocks have been studied almost exclusively in zebrafish, despite the great diversity of species in this group. The rainbow trout undergoes a long embryonic development compared with other species (e.g., zebrafish), which makes it an interesting species for studying the ontogeny of molecular clocks in teleost. In this study, we analyze the expression of clock genes, *clock*, *per1* and *Aanat2*, during embryonic development in rainbow trout from fertilization, using two groups of embryos that were kept under a 12L: 12D photoperiod, and under constant conditions of light, LL. Under LD, the expression of *per1* showed a circadian rhythm from day 8 post-fertilization, while the *clock* expression was rhythmic from day 1 post-fertilization.

However, under LL the expression of these genes was arrhythmic or, in the case of *per1*, showed an altered acrophase. In *Aanat2*, significant night time peaks were measured at both 21 and 42 days post-fertilization under LD conditions, while under LL significant variations over a 24 hour period were only evident at day 42 post-fertilization. The results demonstrate that clocks are present and functional during embryonic development in this species. The mismatch in rhythmic expression of both *clock* and *per1* between the two photoperiod treatments would suggest that as yet unidentified photoreceptor mechanisms are in operation in these early stage embryos.

## **2. SYNCHRONIZATION TO THE FEEDING CYCLES OF MOLECULAR CLOCKS AND PHYSIOLOGICAL AND BEHAVIOURAL RHYTHMS.**

### **2.1 Feeding entrainment of daily rhythms of locomotor activity and clock gene expression in zebrafish brain.**

Light and feeding cycles strongly synchronize daily rhythms in animals, which may, as a consequence, develop food anticipatory activity (FAA). However, the light/food entraining mechanisms of the central circadian oscillator remain unknown. In this study we investigate the existence of FAA in seven groups of zebrafish subjected to a light/dark (LD) cycle or constant

light (LL) and different feeding regimes (random, fasting and feeding in the middle of the light phase or dark phase). The aim was to ascertain whether the daily rhythm of behaviour and clock gene (*per1* and *cry1*) expression in the zebrafish brain was entrained by the light and feeding regime. The results revealed that FAA developed in zebrafish fed daily at a fixed time under LD and under LL. The fish displayed locomotor activity mostly during the daytime, although the percentage of activity during the light phase varied depending on feeding time (ranging from 93.2 to 63.1% in the mid-light and mid-dark fed groups, respectively). However, the different feeding regimes failed to modify the daily rhythm of *per1* and *cry1* expression in the brain of zebrafish under LD (approximate acrophases [peak times] at ZT22 and ZT4, respectively; lights on = ZT0). Under LL, *per1* and *cry1* expression did not show any significant daily rhythmicity, regardless of the feeding regime. These findings indicate that, although schedule-fed zebrafish developed FAA in terms of locomotor activity, feeding had little effect on clock gene expression in whole brain homogenates, suggesting the feeding-entrainable oscillator may be located elsewhere or at specific brain sites.

## **2.2 Effects of feeding schedule on locomotor activity rhythms and stress response in sea bream.**

Feeding cycles entrain the biological rhythms that enable animals to anticipate feeding times and so maximize food utilization and welfare. In this chapter, the effect of mealtime was investigated in two groups of sea bream (*Sparus aurata*): one group received a single daily meal at random times during the light period (random daytime feeding, RDF), whereas the other group received the meal during the light period but at the same time (scheduled daytime feeding, SDF). All the fish showed diurnal behaviour, although the SDF group showed a lower percentage of diurnalism (84.4% vs. 79.5% in RDF and SDF respectively) and developed food anticipatory activity some hours before the mealtime. In addition, the mean daily locomotor activity of the RDF group was significantly higher than that of the SDF group (3132 vs. 2654 counts/day, respectively). Although the mean weight differed between both groups on day 30 (115.7 g and 125.6 g in RDF and SDF, respectively), these differences had disappeared by day 60. Plasma cortisol and glucose significantly differed in both groups (cortisol: 71.8 vs. 8.7 ng/ml, glucose: 53.7 vs. 43.8 mg/dl in RDF and SDF, respectively), whereas lactate did not

differ significantly. The results obtained suggest that altering the feeding time (scheduled vs. random) affects the behavior and physiology of sea bream, indicating that a single daily feeding cycle (compared to random) is beneficial for fish welfare because they can prepare themselves for the forthcoming feed.

## CONCLUSIONS

1. The clock gene, *per1*, was cloned in sea bass. This gene showed a high homology with other *per1* genes of zebrafish and Medaka. In addition, *per1* presents the same structural and functional domains identified in other "Period" proteins of vertebrates.

2. *Per1* is expressed in many tissues, including neuronal and non-nervous tissues. In these tissues, *per1* showed a circadian pattern of expression, with an acrophase or peak expression near the end of the dark phase.

3. In European sea bass larvae, *per1* expression starts in the early stages of development, showing a circadian pattern of expression from day 16 post-hatching under a LD cycle.

4. In sea bass larvae, the photoperiod induces the start of a rhythmic pattern in *per1* expression during development, remained arrhythmic under constant conditions of light and dark. The spectral composition of light used in the LD cycle, also affect the onset of rhythmic expression of this gene. Using blue light that rhythm is detectable from day 5 post-hatching (ie before white light) whereas red light does not induce the start of a rhythm in *per1* expression during the first 16 days post-hatch.

5. The photoperiod affects the expression of clock genes during the embryonic development of rainbow trout. Under a 12L: 12D photoperiod, the rhythmic expression of the clock genes (*Per1* and *clock*) are detectable from day 8 post-fertilization (dpf), while *aanat2* rhythmic expression is detectable from day 21dpf. By contrast, under LL, the expression of clock genes is altered,

6. In rainbow trout embryos, the rhythmic expression of *perl* starts before the development of the classical photoreceptors (pineal and retina), and is not observed under LL, suggesting that this cycle could be initiated by other as yet unidentified photoreceptors.

7 Zebrafish subjected to periodic feeding showed Food Anticipatory Activity, which is manifested by an increase in the locomotor activity in the previous hours prior to meal time.

8. In zebrafish, the oscillator synchronized by food could be located outside the brain, although it cannot be discarded that it is located in a particular area of the brain.

9. In sea bream, scheduled feeding improves animal welfare. When the animals cannot predict the arrival of the food, the levels of stress indicators, such as cortisol and plasma glucose, are increased.

10. In sea bream, random feeding affects behavioural rhythms, increasing the locomotor activity levels. In contrast, periodic feeding induced an increase in locomotor activity in the hours prior to meal time (FAA). In addition, periodic feeding improves growth in sea bream, at least in the short term.