



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS
BIOLOGÍA MARINA



EVALUACION DEL FOTOPERIODO Y LA DENSIDAD DE CULTIVO EN LA EXPRESIÓN
GÉNOMICA RELACIONADA AL CRECIMIENTO DE SALMON ATLANTICO (*SALMO SALAR*).

CAMILA MARCHANT VERA

SEMINARIO DE TÍTULO PARA OPTAR AL TÍTULO DE BIOLOGA MARINA

CONCEPCIÓN - CHILE

AGRADECIMIENTOS

Me es esencial agradecer desde lo más sincero de mi ser a todas aquellas personas que han trabajado conmigo, creyendo en mis capacidades y por sobre todo agradecer a mi mamá Carolina y hermana Martina ellas fueron y son el pilar fundamental en todo este periodo de universidad, a mi pareja, Héctor por haberme apoyado en estos años de estudio y por haber estado conmigo cuando el estrés me superaba, el llanto y dolor corporal ya era parte de mi día a día, fue mi contención emocional en momentos que solo quería dejar la carrera. También quisiera agradecer a mi profesor tutor Ariel Valenzuela y profesor cotutor Sebastián Escobar quienes me guiaron, enseñaron, durante gran parte del proceso de realización de este seminario de título, por su apoyo, voluntad de escuchar y enseñar y por sobre todo por la gran paciencia que ambos tuvieron para escuchar mis constantes consultas y dudas. También agradezco a mi equipo de laboratorio, primero que todo quiero agradecer a Niza por siempre estar presente ante mis consultas, su plena disposición durante las diversas situaciones e inquietudes de laboratorio, Bernardo por la gran disposición ante consultas del ámbito genético donde sin su ayuda todo hubiera sido mucho más difícil, Bastián por brindarme toda su ayuda en el trabajo en la hatchery, y en general por los muchos momentos divertidos en el laboratorio. Agradecer al equipo de laboratorio de la Universidad Católica de Chile, Jessica, Amanda y Alejandro por enseñarme análisis en los cuales no estaba familiarizada, por la paciencia y la buena onda. Agradecer de forma personal, a mis amistades dentro y fuera de la universidad. Pero sobre todo agradecer a mi amiga Nacha, quien siempre estuvo conmigo desde el comienzo de la tesis dándome todo su apoyo, consejos y ánimo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

INDICE FIGURAS.....	4
ÍNDICE DE TABLA.....	5
RESUMEN.....	6
ABSTRACT	8
INTRODUCCION.....	10
1.1 Crecimiento.....	12
1.2 Influencia del fotoperiodo en el crecimiento	13
1.3 Efectos de la densidad de cultivo sobre el crecimiento.....	13
1.4 Crecimiento muscular.....	14
HIPOTESIS.....	15
HIPOTESIS GENERAL.....	15
OBJETIVOS.....	16
OBJETIVO GENERAL.....	16
OBJETIVOS ESPECIFICOS	16
MATERIALES Y METODOS	17
2.1 Cultivo de peces.....	18
2.2 Aislamiento de RNA, obtención del cDNA y cuantificación de expresión génica.....	20
2.2.1- Extracción de ARN desde tejidos.....	21
2.2.2 Diagnóstico de integridad del ARN.....	21
2.2.3 Obtención de los ADNc (cDNA) para realizar la qPCR.....	21
2.2.4 Determinación de la concentración optima de las muestras.....	22
2.2.5 Amplificación de los ADNc por PCR en tiempo real.....	22
2.2.6 Cuantificación relativa.....	24

3.1 Análisis estadístico.....	24
RESULTADOS.....	25
3.2 Parámetros Biológicos.....	26
3.2.1 Crecimiento.....	26
3.2.2 Ganancias.....	27
3.2.3 Tasa específica de crecimiento (SGR).....	28
3.2.4 Factor de condición (K).....	29
3.2.5 Factor de conversión alimenticia (FCR).....	29
3.3 Cuantificación de los niveles de expresión relativa de IGF-1 y GHR por qPCR-RT.....	30
DISCUSION	31
CONCLUSIONES	35
LITERATURA CITADA	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°1. Principales especies de salmónidos en Chile 2021 (Sernapesca, 2020).

Figura N°2. Principales países productores de salmónidos (FAO, 2020).

Figura N°3. Individuo adulto de *Salmo salar* (Tomado de It'snature, 2009).

Figura N°4. Diseño experimental del grupo control y grupos experimentales con sus respectivas densidades iniciales.

Figura N°5. Medición de variables biométricas (longitud y peso) mediante (a) balanza digital (g) y (b) ictiómetro (cm).

Figura N°6. Evolución de longitud (cm) de *S. salar*, de los estanques control (FT LD 24:00/D1 y FT LD 13:11/D1) y estanques experimentales (FT LD 24:00/D12 y FTLD 24:00/D2) durante las 4 semanas de experimento. Las barras indican los valores promedio y sus desviaciones estándar.

Figura N°7. Evolución del peso (gr) de *S. salar*, de los estanques control (FT LD 24:00/D1 y FTLD 13:11/D1) y estanques experimentales (FT 24:00/D12 y FTLD 24:00/D2) durante las 4 semanas de experimento. Las barras indican los valores promedio y sus desviaciones estándar.

Figura N°8. A: Tendencia de la longitud (cm) y B: Peso (gr) del salmón atlántico para los cuatro grupos estudiados desde el T-0 hasta T-30.

Gráfico N°9. Tasa específica de crecimiento (SGR) del peso corporal de *S. salar*, para los 30 días de tratamiento a fotoperiodo 24:00h y 13:11h.

Figura N°10. FCR promedio para cada grupo sometido a experimento durante 30 días.

Figura N°11. Valores calculados de Fold Change para la expresión relativa de los genes GHR e IGF-1 a T1 y T2, para los 4 grupos de estudio.

INDICE DE TABLAS

Tabla N°1. Resumen de los primers forward (f) y reverse (r) utilizados para el análisis por real-time (qPCR).

Tabla N°2. Programa de amplificación por PCR en tiempo real para todos los genes analizados. Se especifica cada una de las etapas, cantidad de ciclos y las respectivas temperaturas utilizadas.

Tabla N°3. Valores de ganancia longitud (cm) y peso (gr) para los cuatro grupos experimentales al final del experimento T=0.

Tabla N°4. Valores del Factor de condición (K), semana tras semana en los estanques sometido a fotoperiodos LD 24:00/D1, LD24:00/D2 y fotoperiodo LD13:11/D1 y LD 13:11/D2.

RESUMEN

Los estudios sobre el crecimiento somático en peces de cultivo bajo el manejo de diversas variables son de especial interés en la industria acuícola. La importancia para la industria es fundamentalmente económica, donde se busca minimizar costos de producción y mejorar la calidad del producto final. Identificar una variable que incida en el crecimiento, le da una herramienta de manejo al centro de cultivo que se puede traducir en un crecimiento más rápido, lo que significará disminuir los tiempos de cultivo y bajar los costos de producción, al disminuir los gastos en alimento, también puede significar la optimización del cultivo, logrando un producto de mayor calidad. En este trabajo de investigación se evaluó el efecto del fotoperiodo de 24 horas, a densidad alta y baja, sobre el crecimiento de juveniles de *Salmo salar*. El estudio se complementó con análisis moleculares del eje del crecimiento GH/GHR/IGF-1.

Se conformaron 4 grupos, por duplicado, se estudiaron dos fotoperiodos (24h y 13:11h) a densidad de cultivo alta (20kg/m³) y baja(9kg/m³). El tiempo total del ensayo fue de 30 días totales. Se registraron los datos biométricos semanalmente. Y para estudiar el efecto del fotoperiodo a nivel molecular, se determinaron los niveles de expresión génica en tejido muscular de IGF-1 y GHR. La expresión de estos genes se realizó por el método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), mediante la técnica fluorométrica de PCR en tiempo real (qPCR) y la Transcriptasa Reversa (qPCR-RT).

En los estudios de expresión relativa de los genes de interés, encontramos evidencias significativas que el fotoperiodo tiene efectos sobre la expresión de genes relacionados con el crecimiento somático en peces *Salmo salar*. Se observaron, a tiempo T1 y T2, diferencias significativas en la expresión relativa de los genes GHR y IGF-1 entre grupos LD13:11DB (grupo control) y grupos con fotoperiodo continuo LD24:00 tanto a densidad baja como alta. Al finalizar el periodo de experimentación, tiempo T2 (día 30) los grupos LD24:00 (D1 y D2) presentaron una mayor expresión relativa de receptores GHR y menor expresión del factor IGF-1. No se encontró a tiempo T2 evidencia estadística que indique un efecto de la densidad sobre las expresiones de los genes de interés, entre grupo control LD13:11DB y LD13:11DA. Lo que nos sugiere que las diferencias en la expresión de los genes GHR y IGF-1 al finalizar el experimento (tiempo T2), observada para los grupos con LD24:00 se debería al uso de fotoperiodo de luz continua. A tiempo T1 (día 14) la expresión relativa de IGF-1 fue mayor en grupos con LD24:00 que grupos LD13:11, lo que se invirtió al día 30 (tiempo T2), donde los grupos LD24:00 mostraron menor expresión relativa de IGF-1 que el grupo control (LD13:11DB). Este comportamiento en el tiempo, de la expresión de IGF-1, podría ser

explicado como efecto de procesos y mecanismos de respuestas celular, que se observan cuando se trabaja con organismos celulares vivos y dinámicos.

Correlacionando los datos biométricos con los de expresión de los genes de interés, podríamos concluir, una vez finalizado nuestro experimento, que la aplicación de fotoperiodo LD24:00 inhibiría el crecimiento en el tejido muscular de los peces, afectando procesos celulares y moleculares a nivel celular, en el tejido muscular de los peces presmolt, lo que tendría efectos sobre la expresión de los genes GHR y IGF-1. El aumento relativo de receptores GHR para los grupos con fotoperiodo LD24:00 podría ser un mecanismo celular compensatorio a la disminución de la expresión de IGF-1 observada.

Este trabajo vendría siendo el primer reporte sobre los efectos del fotoperiodo sobre el crecimiento y la expresión de genes GHR y IGF-1 en peces juveniles presmolt *S. salar*, en un periodo de 30 días de tratamiento, lo cual requerirá de nuevos ensayos para confirmar nuestros resultados.

ABSTRACT

Studies on somatic growth in farmed fish under the management of various variables are of special interest in the aquaculture industry. The scope for the industry is fundamentally economic, where it seeks to minimize production costs and improve the quality of the final product. Identifying a variable that affects growth gives the farm a management tool that can translate into faster growth, which will mean reducing cultivation times and lowering production costs, by reducing food costs; it can also involve a culture optimization, achieving a higher quality product. In this research we study the effect of the 24-hour photoperiod, at high and low density culture, on the growth of *Salmo salar* juvenile was evaluated. . The study was complemented with molecular analyzes of the GH/GHR/IGF-1 growth axis.

Four groups were formed in duplicate, two photoperiods (24h and 13:11h) were studied at high and low culture density. The time assay was of 30 days. Biometric data was recorded weekly. And to study the effect of photoperiod at the molecular level, the gene expression levels of IGF-1 and GHR in muscle tissue were determined. The expression of these genes was carried out by the method of Polymerase Chain Reaction (PCR), using the real-time PCR fluorometric technique (qPCR) with Reverse Transcriptase (qPCR-RT).

In the relative expression studies of our genes of interest, we found significant evidence that photoperiod has effects on the expression of genes linked to the somatic growth in *Salmo salar* fish. Significant differences in the relative expression of the GHR and IGF-1 genes were observed at time T1 and T2 between the LD13:11DB groups (control group) and groups with continuous photoperiod LD24:00 at both low and high density. At the end of the experimentation period, time T2 (day 30), the LD24:00 groups (D1 and D2) presented a higher relative expression of GHR receptors and lower expression of the IGF-1 factor. No statistical evidence was found for some effect of density on the expressions of the genes of interest, between the control group LD13:11DB and LD13:11DA. This suggests that the differences in the expression of the GHR and IGF-1 genes at the end of the experiment (time T2), observed for the groups with LD24:00, would be due to the use of continuous light photoperiod. At time T1 (day 14) the relative expression of IGF-1 was higher in groups with LD24:00 than groups LD13:11, which was inverted at day 30 (time T2), where the groups LD24:00 showed lower relative expression of IGF-1 than the control group (LD13:11DB). This behavior in time, of the expression of IGF-1, could be explained as an effect of processes and mechanisms of cellular responses, which are observed when working with living and dynamic cellular organisms.

By correlating the biometric data with genes expression, we could conclude, that at the end of our experiment, the application of LD24:00 photoperiod would inhibit growth in the muscle tissue of fish, affecting cellular and molecular processes at the cellular level, in the muscle tissue of presmolt fish, which would have effects on the expression of the GHR and IGF-1 genes. The relative increase in GHR receptors for the groups with LD24:00 photoperiod could be a compensatory cellular mechanism for the decrease in IGF-1 expression observed.

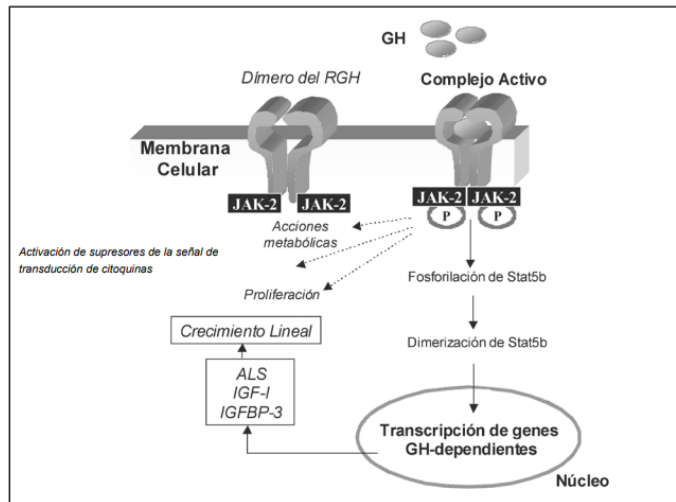
This work would be the first report on the effects of photoperiod on the growth and expression of GHR and IGF-1 genes in juvenile presmolt of *S. salar* fish, in a period of 30 days of treatment, which will require new trial studies to confirm our results.

INTRODUCCION

La acuicultura nacional ha tenido un gran crecimiento en su producción en los últimos años. Actualmente Chile es el segundo productor mundial de salmónes de cultivo después de Noruega y superando a países como Escocia y Canadá. Las especies principales cultivadas son el salmón del atlántico (*Salmo salar*), salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Figura N°1). La acuicultura chilena se desarrolla fundamentalmente en ambientes marinos costeros y, secundariamente, en ambientes dulceacuícolas. Es por esto que la mayor producción corresponde al cultivo intensivo de salmónidos en sistemas suspendidos (balsas-jaulas) localizados en ambientes marinos y estuarinos, mientras que secundariamente en ambientes dulceacuícolas (pisciculturas).

A pesar del fuerte crecimiento de la industria acuícola en Chile, ésta se ha visto afectada por el surgimiento de diferentes brotes infecciosos y otros problemas inherentes que han impactado negativamente su desarrollo (FAO 2016). El sector presentó importantes pérdidas económicas y generó altos niveles de desempleo por causa del virus ISA el 2007 (Katz et al., 2011). Una de las razones asociadas es la alta densidad de cultivo a la cual se mantenían los peces (30-40 kg/m³) ya sea por el estrés producido por competencia, espacio, alimento etc. (Dunning et al., 1998) así como también por falta de oxígeno (asociado a las altas densidades de cultivo) lo que perjudica el crecimiento y el desarrollo de los peces (Mallya,2012). Posterior a la crisis del virus ISA los sistemas de flujo abierto fueron regulados en términos de producción, la norma estableció que esos sistemas de cultivo no pueden pasar los 20 kg/m³ (Henriksen y col.,2013). Con el tiempo se abrió aún más el camino a los sistemas de recirculación acuícola agua (SRA), sistemas en los que el agua es continuamente limpiada y reutilizada (Libey, 1993). En un SRA se monitorea y controlan los parámetros fisicoquímicos del agua como la temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, dióxido de carbono, entre otros. El control de los parámetros fisicoquímicos permite la producción continua a lo largo del año y con una disminución significativa del impacto ambiental y optimizando el crecimiento de los peces (Timmons et al. 2002). Los sistemas de SRA se caracterizan por permitir cultivos a altas densidades (Martinez,2014), esto genera un menor costo de inversión por pez; sin embargo, para que ésta tenga un efecto positivo sobre el costo de producción no se debe poner en riesgo el bienestar, el rendimiento y la salud de los peces, lo que a su vez dependerá netamente de la renovación del agua, del acceso adecuado a la alimentación y del grado de interacciones sociales entre los individuos. La temperatura, fotoperiodo y disponibilidad de alimento influyen sobre el crecimiento y desarrollo de los vertebrados ectotérmicos como los peces (Thorpe et al., 1989, Boujard et al., 1995, Imsland et al.,

1995, Jobling and Koskela, 1996 citado en Taylor J.F., 2006). Uno de los factores ambientales que se utiliza para disminuir el tiempo de cosecha y de tal forma que lleve la producción a su máximo rendimiento es el fotoperiodo artificial, ya que influye en el crecimiento y otras actividades metabólicas (Reynalte-Tataje et al., 2002). Shahrzad Barimani (2016) citando a Ergun et al. (2003), Sonmez et al. (2009), El-Sayed y Kavanna (2004), Biswas et al. (2005), Danisman y Yigit (2009), Arvedlund et al. (2000), Hart et al. (1999) y Turker et al. (2005) indican que el fotoperiodo continuo puede afectar positivamente en el incremento de la tasa de crecimiento, el cual se evidencia mediante la expresión de genes de crecimiento. GH (hormona de crecimiento) actúa como el mayor regulador del crecimiento (Chang y Wong, 2009). Definiendo el crecimiento como cambios en longitud y/o peso en el tiempo (Beckman, 2011). Esta regulación de crecimiento está mediada por sus receptores GHR (recepto de la hormona de crecimiento) que se expresan principalmente en el hígado (Pierce et al., 2012). Varios estudios han demostrado que IGF-I es el mediador más importante de las funciones de GH (Mommsen, 2001; Inoue et al., 2003), aunque de igual manera esta hormona también tiene efectos directos independientes de IGF-I (Pierce et al., 2012). Los ensayos biológicos permitieron mostrar un rol fundamental de IGF-1 en el crecimiento y fueron fundamentales para el establecimiento de la hipótesis inicial de las somatomedinas por cuanto IGF-1 actuaba como mediador de los efectos biológicos de GH en el crecimiento (Le Roith y col., 2001).



FiguraN°1: Modelo de mecanismo de activación del RGH. La GH se une a un dímero constitucionalmente formado del RGH en la membrana celular. En consecuencia, los RGH rotan y permiten que las Jak2 unidas al dominio intracelular de los mismos se alineen apropiadamente y se transfosforilen mutuamente iniciando la cascada de transducción de señal intracelular. (Fuente: Human Growth Hormone (GH) Receptor and the High Affinity GH-Binding Protein. Ballerini, M.G. y col. RAEM. 2008, Vol 45 N°1).

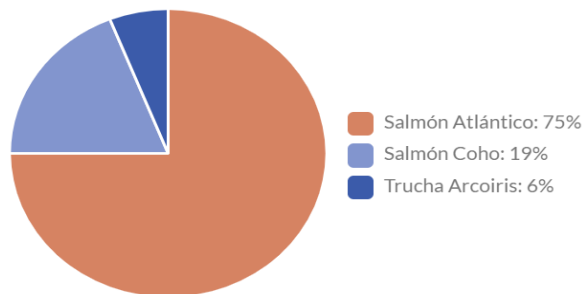


Figura N° 1. Principales especies de salmónidos en Chile 2021(Sernapesca,2020).

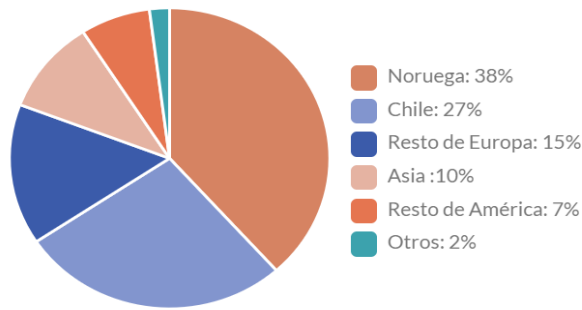


Figura N°2. Principales países productores de salmónidos (FAO,2020).

1.2.- Crecimiento

El crecimiento de un pez puede ser definido como el cambio en el tamaño (longitud total) que ocurre en un cierto periodo de tiempo, el cual resultará en un cambio en la masa corporal (peso total) del mismo. De tal forma que longitud y peso están relacionados y en peces teleósteos se definen con la siguiente ecuación:

$$\text{Peso(g)} = \text{CF(g/cm}^3\text{)} \times \text{Largo(cm)}^3 \text{ o } P = K \times L^3$$

donde CF es el Factor de Condición de Fulton (K), L es la Longitud total en cm y P es el Peso total en gr.

Este K, es un valor fundamental que relaciona longitud y peso de un pez, ya que un incremento en peso no implica necesariamente un incremento en el tamaño, de la misma forma un aumento de tamaño no siempre significa un aumento en peso del individuo. Así, el crecimiento en tamaño y el crecimiento en peso pueden considerarse como dos procesos diferentes que deben evaluarse en forma independiente en un estudio de crecimiento, las variables Peso y Longitud están integradas y permite un análisis del crecimiento más completo, siendo un índice representativo del crecimiento real del pez (Shulgina NS et al.,2021).

1.3 Influencia del fotoperiodo en el crecimiento

El fotoperiodo es una de las principales señales medioambientales que sincronizan diversas etapas de desarrollo en peces e incluyen patrones conductuales, fisiológicos, morfológicos y reproductivos determinando los ajustes estacionales de dichos patrones. En varias especies de teleósteos, el fotoperiodo está asociado a la plasticidad del crecimiento somático, entendiéndose como crecimiento somático todos los procesos involucrados en el desarrollo del pez, desde síntesis proteica en el citoplasma celular y

los procesos moleculares de traducción de señales que se requieren, sin embargo, en peces, estos procesos falta profundizar conocimiento. El fotoperíodo y la temperatura son los principales factores ambientales que inciden directamente sobre el sistema nervioso central (SNC) y en particular sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónada (HHG) de los peces (Shulgina NS et al.,2021).

A través de su distribución geográfica, el salmón del atlántico está sometido a diversos grados de fotoperiodo sujetos a la estacionalidad geográfica propia de cada zona. Indudablemente, el pez se adapta a las diferentes condiciones ambientales, que van a determinar su crecimiento (Sánchez, 1999).

1.4 Efectos de la densidad de cultivo sobre el crecimiento

La cantidad de peces presentes en un sistema de cultivo puede afectar el crecimiento de estos organismos por competencia intraespecífica, (por disponibilidad de alimento, efectos metabólicos debido a la acumulación de desechos tóxicos tipo amonio y nitritos, incremento en el estrés que lleva a agresividad y eventualmente a lesiones) y disminución de los niveles de oxígeno, (Paul et al, 2006; Bailey, 2000).Además de lo anterior, en el manejo productivo, es importante controlar la dispersión de los tamaños de los peces en la unidad de cultivo. El manejo de la densidad es un factor importante en esta etapa, lo cual permite obtener un mayor provecho en el proceso de producción.

Crecimiento muscular

en aves y mamíferos, el crecimiento muscular postembrionario está determinado por la hipertrofia (aumento de tamaño de las fibras musculares existentes). En cambio, en peces, el crecimiento muscular, incluye, además de la hipertrofia, a la hiperplasia (aumento en el número de fibras), debido a un aumento de miotubos y la síntesis de nuevas miofibrillas; ambos procesos se mantienen a lo largo de toda la vida de los peces y son regulados en etapas tempranas del desarrollo, por la expresión celular de factores de transcripción, conocidos como factores reguladores miogénicos (MRF).Los MRF constituyen una gran familia de transcritos (mRNA), que incluyen activadores e inhibidores en los procesos de proliferación celular (mioblastos) y crecimiento celular, participando en los mecanismos de hipertrofia e hiperplasia de los peces. Factores ambientales como el fotoperiodo y la temperatura externa pueden afectar la expresión de genes que codifican estas proteínas que regulan la miogénesis y el crecimiento muscular (Shulgina NS et al.,2021).

Un inhibidor del crecimiento muscular es la miostatina, es un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF β), que se expresa principalmente el músculo esquelético.

En cambio factor de crecimiento tipo insulina 1 o IGF-1 (insulin-like growth factor-1) es un reconocido promotor o activador del crecimiento y la proliferación celular. La síntesis de IGF-1 es gatillada por la hormona del crecimiento (GH) y otros factores como la hormona tiroidea (TH) o estrógenos. La expresión de IGF-1 estaría siendo regulada por GH, en todos los tejidos y órganos, lo cual convierte a los peces teleósteos únicos en relación con otros vertebrados, en cuanto a que GH regularía principalmente a IGF-1. La unión de GH a su receptor GHR desencadena una cascada de señales que llegan al núcleo celular, activando la expresión del gen de IGF-1.

A su vez la expresión y liberación de GH está regulada por un complejo mecanismo que involucra varias moléculas activadoras e inhibitorias. El receptor GHR, es una proteína de transmembrana con un dominio extracelular y otro intracelular, que también se encuentra finamente regulada, por factores inhibidores y activadores, lo mismo sucede con su síntesis de novo en la transcripción y traducción génica.

La mayoría de los estudios de crecimiento muscular en peces se centran en evaluar los niveles, IGF-1, GHR y/o sus respectivos ARNm. En muchas especies de peces, los niveles plasmáticos de IGF-1 o la expresión de su mensajero, se correlacionan con la cantidad de alimento ingerido, su contenido proteico y con la tasa de crecimiento. También se ha descrito incrementos de IGF-1 con la temperatura y la duración del día o fotoperiodo.

Crecimiento compensatorio

Se observa frecuentemente que luego de un período de retardo en el crecimiento debido a condiciones de entorno desfavorables hay un crecimiento acelerado. Este fenómeno se denomina crecimiento compensatorio y fue descrito inicialmente en mamíferos y en otros animales domésticos endotermos, aunque también ha sido estudiado en varios grupos de peces teleósteos. Entre las condiciones desfavorables que provocan este retraso en el crecimiento y posterior crecimiento compensatorio al ser aquellas revertidas, se encuentran la disminución en las interacciones sociales y la restricción alimentaria, sin embargo, pocos estudios se han focalizado en el estudio de la expresión de los componentes del eje GH/IGF-1.

Es importante notar que el crecimiento compensatorio ha sido observado en una variedad de especies, condiciones de laboratorio y manipulación experimental. Por ejemplo, dicho fenómeno fue documentado en peces que han sido mantenidos durante el transcurso de los experimentos en peceras comunitarias, es decir, donde la cantidad de peces por peceras era mayor a uno. Así mismo, también se ha observado crecimiento

compensatorio en diseños experimentales donde los peces son mantenidos aislados en peceras individuales bajo condiciones de ayuno y retroalimentación.

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS GENERAL

H0: La aplicación del fotoperiodo de luz continua (LD 24: 0) no produce cambios en la expresión de genes de crecimiento GHR y IGF-1 en salmón atlántico.

H1: La aplicación del fotoperiodo (luz continua LD 24: 0) produce cambios en la expresión de genes de crecimiento GHR y IGF-1 en salmón atlántico.

H0: El efecto combinado de fotoperiodo y densidad no produce alteración en el crecimiento somático en individuos de Salmon atlántico

H1: El efecto combinado de fotoperiodo y densidad produce alteración en el crecimiento somático en individuos de Salmon atlántico

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar los efectos del fotoperiodo LD 24:00 y densidad (9kg/m³ y 20 kg/m³) sobre el crecimiento en juveniles de salmo salar, en un sistema RAS.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el crecimiento y eficiencia de alimentación de salmón atlántico mantenidos a distintas densidades en un RSA por medio de parámetros biométricos de crecimiento SGR y FC etc.
2. Determinar y analizar los niveles de expresión de GHR y IGF-1 en peces sometidos a fotoperiodo natural y artificial.
3. Evaluar la influencia entre densidad y fotoperiodo en el crecimiento de Salmon atlántico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Mantenimiento de peces

la mantención de los peces se realizó en las instalaciones del laboratorio de piscicultura patología acuática Depto Oceanografía, Fac Cs Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción

Para llevar a cabo el experimento se trabajó con peces presmolt , donde utilizamos ocho estanques de fibra de vidrio circulares de 50 L cada uno. Se trabajó con cuatro grupos, LD 24:0/D1 (control 1), LD 24:0/D2 (experimental 1), LD 13:11/D1 (control 2) y LD 13:11 D/2 (experimental 2) con sus respectivas replicas, con dos densidades iniciales distintas D1:9kg/m³ y D2: 20Kg/m³ (Figura 4). En la estructura superior del estanque se colocó un foco de luz fría de 5 W que otorgo luz a los cuatro estanques experimentales. Todo esto, cubierto por bolsas de plástico negras, para eliminar la entrada de luz artificial hacia los estanques con los que se manejó LD 13:11.



Figura N°3. Individuo adulto de *Salmo Salar* (Tomado de It'snature, 2009).

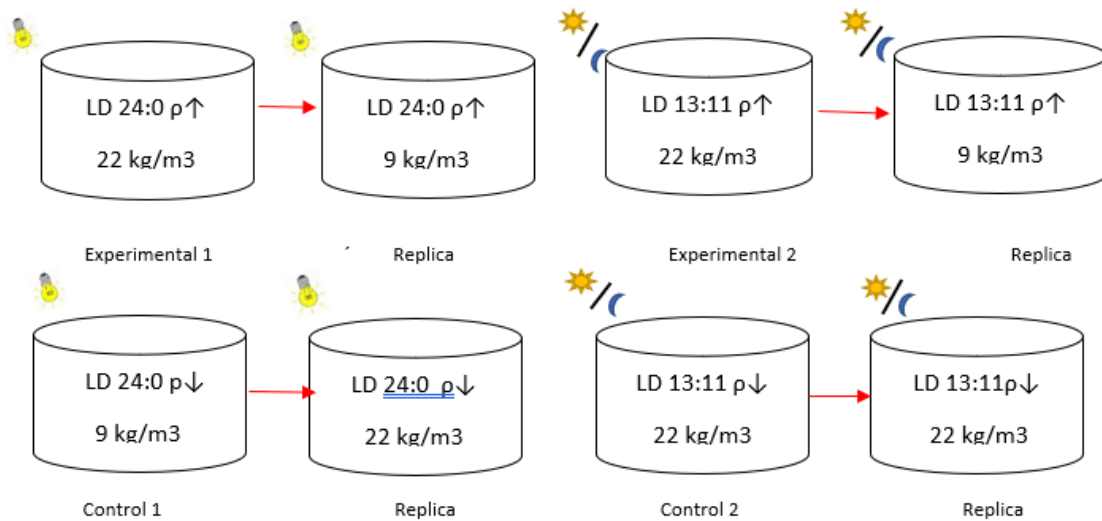


Figura N°4. Diseño experimental del grupo control y grupos experimentales con sus respectivas densidades iniciales. Falta indicar el n total por cada estanque

El tiempo total del ensayo fue de 30 días comenzado en octubre y finalizando noviembre del 2022. En cada estanque se midieron periódicamente los parámetros fisicoquímicos del agua de cultivo (O₂, Temperatura, pH, Salinidad). El OD y temperatura se determinó con un oxigenómetro polarográfico, el pH se midió por medio de un pHmetro y la salinidad con un refractómetro óptico, (3ppm de sal por sistema de 150 L en total) calculado en base a la cantidad de litros de agua que soporta el sistema. Los peces recibieron alimentación a una tasa del 1,5% en peso con pellet comercial 3 mm, Biomar Chile.

Semanalmente se realizaron las mediciones biométricas, registrando la longitud y peso de todos los individuos de estudio (11 y 27 individuos por estanque), por medio de una balanza digital (g) y un ictiómetro (cm) (Figura 5).

Con los datos biométricos se calculó la tasa específica de crecimiento (SGR) para evaluar la velocidad de crecimiento de los peces de acuerdo a la siguiente fórmula

$$SGR = \frac{(\ln (Wf) - \ln (Wi))}{T} \times 10$$

Donde, W1 y W2 son el peso inicial y el peso final respectivamente y n es el número de días del periodo entre muestreos.

Para evaluar los efectos de fotoperiodos y densidades sobre el crecimiento se calculó el factor de condición corporal de Fulton (K), cuyo índice relaciona el peso y la longitud de las muestras. Se calculó siguiendo la fórmula:

$$K = (W(\text{gr}) / L(\text{cm})^3) \times 100$$

Donde, W es el peso total y L es la longitud total de cada pez

Factor de conversión alimenticia (FCR)

Para determinar la ganancia de peso de los individuos cultivados con relación al peso de alimento utilizado se calculó el FCR, es una medida de eficiencia y la sustentabilidad de la producción, indica las unidades de alimento necesarias para producir una unidad de biomasa.

$$\text{FCR} = \frac{\text{peso de alimento consumido sobre un tiempo(kg)}}{\text{biomasa final (kg)-biomasa inicial(kg)}}$$

Ganancias

Las Ganancias en longitud y en peso, es un valor absoluto que muestra el crecimiento neto en longitud y en peso. Visualiza de forma clara el crecimiento neto de los individuos en estudio, independiente de su tamaño y peso iniciales, es aplicable solo para muestras de grupos con peso y tallas similares.

Ganancia en longitud (GL)

Es el aumento total de la longitud que obtuvieron todos los peces durante el cultivo y se obtiene calculando la longitud final menos la longitud inicial:

$$GL = L_f - L_i$$

Donde Lf es la longitud total final y Li la inicial.

Ganancia en Peso (GP)

Es el aumento total en peso que obtuvieron todos los peces durante el cultivo y se obtiene calculando el peso final menos el peso inicial:

$$GP = Pf - Pi$$

Donde Pf es peso total final y Pi el peso inicial.

(a)



(b)



Figura N°5. Medición de variables biométricas (longitud y peso) mediante (a) balanza digital (g) y (b) ictiómetro, o (cm).

Los valores del factor de condición K se determinaron para los muestreos a tiempos T-0, T-15 y T-30, inicio del ensayo, al día 15 y al finalizar el experimento respectivamente.

Para los muestreos se recogieron al azar 3 peces por grupo y por estanque. A cada individuo se le extrajo 1 gr de tejido muscular, se procedió a agregar 1ml de RNA later para luego ser almacenadas a -20°C hasta su procesamiento y posterior análisis.

2.2 Aislamiento de RNA, obtención del cDNA y cuantificación de expresión génica

Los análisis moleculares fueron hechos en Santiago, Pontificia Universidad Católica de Chile. En el laboratorio de Acuicultura.

2.2.1- Extracción de ARN desde tejidos.

Para la extracción de ARN de las muestras a analizar mediante qPCR-RT, se utilizó el kit de extracción E.Z.N.A.[®] Total RNA Kit I, Total RNA Extraction Kit de Omega Bio.Tek y el reactivo TRIzol de Invitrogen; y se procedió de acuerdo a protocolo del kit proporcionado por el proveedor.

Se centrifugaron las muestras a 8.000 x g por 10 min a 4°C, se dejaron reposar por 5 (min) posteriormente se agregó 400 µL de cloroformo, se agito por inversión durante 15 (s) , Las muestras reposaron a temperatura ambiente durante 15 minutos y luego se separaron las fases mediante una centrifugación a 12000x g por 15 (min) a 4°C, se conservó solo la fase acuosa superior la cual se transfirió a un tubo de 1.5 frío. Se agregó 400 uL de ETOH 70% se agitó y se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones. Se eliminó el sobrenadante luego se agregó 500 uL de RNA Wash Buffer I para posteriormente Centrifugar a 12.000 x g durante 1 min a temperatura ambiente. El RNA purificado se trató con DNasa, para eliminar posible contaminación con ADN (Mix Digestion DNasa - Thermo Scientific), el cual consta de 21,5 µL de H₂O biomol , 2,5µL buffer DNasa 10X y 1 µL DNasa, y se agregan 25 uL por muestra de mix directamente a la membrana de la columna se añadió 250 uL de Wash buffer I y se procedió a centrifugar bajo las mismas condiciones luego se agrega 500 uL de RNA Wash Buffer II se repitió la centrifugación bajo las mismas condiciones.

2.2.2 Diagnóstico de integridad del ARN

Para el diagnostico de integridad de los ARN extraídos se evaluaron en placas PCR de gel de agarosa preparado al 1%, y se procesaron en equipo lector de microplacas de Tecan Trading AG, Switzerland. Para evaluar la pureza de la muestra se realizó mediante técnicas espectrofotométricas, utilizando el equipo NanoDrop 2000c de Thermo Scientific, y las muestras se leyeron a una absorbancia de 260/280 nm, los valores se cuantificaron en ng/ul.

2.2.3 Obtención de los ADNc (cDNA) para realizar la qPCR.

La retrotranscripción de los ARN a ADN complementario (ADNc), mediante la transcriptasa reversa (RT) se realizó con el kit Superscript first II de Thermo Fisher Sci y se procedió de acuerdo al protocolo del fabricante. Todo el procedimiento se efectuó en la máquina TECAN lector de microplacas y se procedió con la reacción RT.

Para definir la concentración inicial de ADNc que se agregará al Mix para realizar la amplificación en la qPCR se empleó el método de las diluciones seriadas.

2.2.4 Determinación de la concentración óptima de las muestras.

Para definir la concentración inicial de ADNc a utilizar en la qPCR se empleó el método de las diluciones seriadas. Se utilizaron las siguientes diluciones en microtubos Dnasa/Rnasa free: 1000ng/μL, 400ng/μL, 200ng/μL, 100 ng/μL, 50ng/μL. A partir de la curva obtenida se determinó que la concentración óptima de los ADNc a emplear para los análisis de las muestras es de 50ng/ul.

2.2.5 Amplificación de los ADNc por PCR en tiempo real

Uno de los métodos más adecuados para cuantificar el nivel de transcritos (ARNm), es la PCR en tiempo real con transcriptasa reversa, qRT-PCR, el cual tiene un alto grado de sensibilidad; sin embargo, la confiabilidad y el éxito del método de cuantificación relativa radica en la normalización mediante el uso de uno o varios genes endógenos (también conocidos como normalizadores), lo que permite calcular el nivel de expresión génica relativa. Este tipo de normalización reduce significativamente errores como diferentes cantidades de ARNm inicial entre las muestras que serán retrotranscritas (pasarlas de ARNm a ADNc), variaciones en la eficiencia de reacción, integridad de ARN, presencia de inhibidores de PCR y errores instrumentales.

Un aspecto muy importante en la qPCR-RT es el análisis posterior de los resultados de la amplificación de las muestras de ARNm, donde la normalización determina la interpretación final del resultado.

La normalización con genes de referencia endógenos es el método para calcular la cantidad de ARNm en las muestras, y consiste en la comparación paralela del gen de interés contra el control interno. Los genes normalizadores, deben tener una expresión constante o similar entre diferentes tejidos y estados de desarrollo, además deben ser ARNm estables y en cantidades suficientes. Finalmente, esta etapa post-resultados obtenidos, requieren someterlos a una serie de paquetes estadísticos para obtener un valor estabilizado de expresión relativa del gen en estudio, valorado respecto al control interno.

En estudios de expresión génica en músculo de pez, los genes normalizadores que son más utilizados, por cumplir las condiciones señaladas más arriba son:

- ✓ El factor de elongación 1 α (EF1a). Es una proteína abundante en el citoplasma de células en crecimiento y participa en la etapa de síntesis proteica (en la traducción del ARNm a proteína). Es un gen de expresión constitutiva de un pez y específico para salmónidos.
- ✓ Proteínas ribosomales

- ✓ ARNr (ARN ribosomal), se encuentra en cantidades constantes en las células somáticas y forman una amplia familia. Existen una gran cantidad de genes codificantes para estas proteínas.

En este trabajo se escogieron al EF1-alfa y al ARNr subunidad 18s como nuestros genes normalizadores, reportados como normalizadores efectivos y eficientes para tejido muscular de peces, por su estabilidad, homogeneidad y buen nivel de expresión.

Los ensayos de amplificación de los ADNc se realizaron en el equipo Termociclador en tiempo real (CFX96 Real-Time System). Empleando el kit de amplificación en tiempo real Brilliant II SYBR Green QPCR master mix de Stratagene.

Las condiciones y protocolo para los genes por Q-PCR se muestran en la tabla N°2.

Tabla N°1. Resumen de los primers forward (f) y reverse (r) utilizados para el análisis por real-time (qPCR).

Nombre Primers	Secuencia Primers
IGF-1 Forward	CTCCCAAGATTTCTCGCTCTG
IGF-1 Reverse	CCCTTCTCCGCTTTACTAACC
GHR Forward	GTCTTGTGCAGGGACAGCCCTT
GHR Reverse	AGGTGTGGGTCCAGGCTTCA
EF1a Forward	AGCGCAATCAGCCTGAGAGGTA
EF1a Reverse	GCTGGACAAGCTGAAGGCTGAG
18S Forward	GGAGTATGGTTGCAAAGCTG
18S Reverse	TCTGTCAATCCTTTCCGTGTC

Tabla N°2. Programa de amplificación por PCR en tiempo real para todos los genes analizados. Se especifica cada una de las etapas, cantidad de ciclos y las respectivas temperaturas utilizadas.

	Paso	Temperatura	Tiempo	Detección
Desnaturalización	1	95°	3 minutos	-
Cicling (40 ciclos)	2	95°	3 segundos	-
	3	60°-65°	20 segundos	Green
Elongación	4	60°	20 segundos	Green

2.2.5 Cuantificación relativa

Los niveles de expresión génica de GHR y IGF-1 se determinaron por cuantificación relativa, se utilizaron los Ct calculados para cada muestra y se normalizaron respecto a los valores obtenidos de los genes normalizadores. Los genes de referencia utilizados fueron el RNA 18s y el EF-a, ambos genes normalizadores recomendados para tejido muscular.

Las muestras analizadas corresponden a tiempo T1 y T2. Donde T1 son muestras recogidas el día 14 y T2 son las muestras tomadas el día 30.

El cálculo se obtuvo mediante el método Delta Ct, ajustado con el protocolo de Pfaffl que corrige de acuerdo a la eficiencia de los partidores.

Los valores se expresaron como el número de cuentas FOLD CHANGE, utilizando como control referencial al grupo con fotoperiodo LD13:11 a densidad baja.

3.1 Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los parámetros biológicos fue analizado por el programa estadístico R software, en el cual la longitud total, peso corporal, tasa de específica de crecimiento (SGR), factor de condición (K) se analizaron mediante la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. Los resultados se presentan como la media y su intervalo de confianza al 95% (IC), y se tomaron como diferencias significativas aquellas que poseían un valor de probabilidad $P < 0.05$. Respecto a los datos genómicos para establecer diferencias entre tratamientos, los valores de cambio de pliegue de los genes se sometieron a una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0.05$) y para determinar

la significancia se realizó una T-student de dos colas. Ambas pruebas fueron corregidas con distancias de Mahalanobis, distancias de Jackknife y pruebas de valores atípicos T2. Y cada prueba estadística se realizó en el software estadístico JMP7. Y después de que se eliminaron los valores atípicos, se volvió a calcular el cambio de pliegue, este proceso de limpieza de datos se realizó solo una vez.

RESULTADOS

3.2 Parámetros Biológicos

3.2.1 Crecimiento

Los resultados promedios por grupo de los parámetros biométricos se muestran en las siguientes graficas:

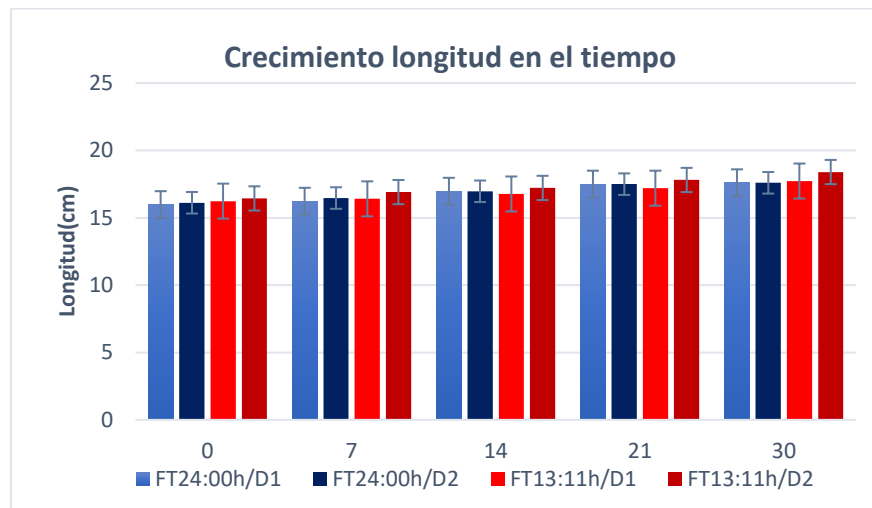


Figura N°6. Evolución de longitud (cm) de *S. salar*, de los estanques control (FT LD 24:00/D1 y FT LD 13:11/D1) y estanques experimentales (FT LD 24:00/D12 y FTLD 24:00/D2) durante las 4 semanas de experimento. Las barras indican los valores promedio y sus desviaciones estándar.

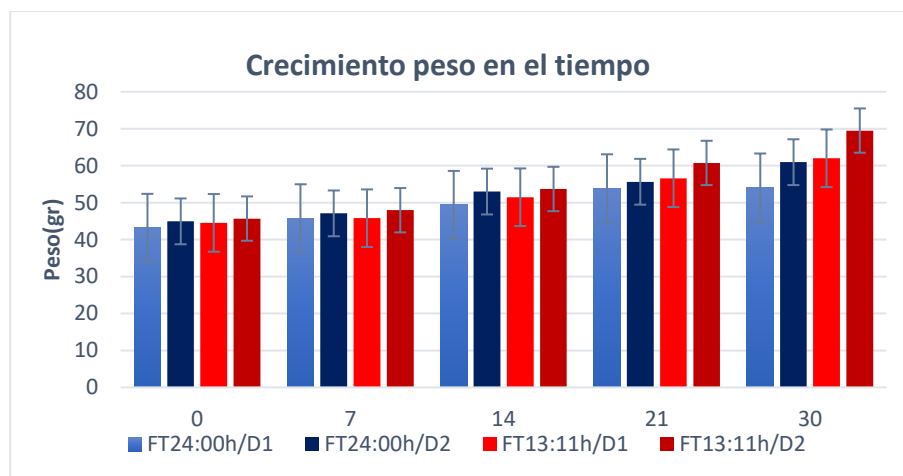


Figura N°7. Evolución del peso (gr) de *S. salar*, de los estanques control (FT LD24:00/D1 y FTLD13:11/D1) y estanques experimentales (FT24:00/D12 y FTLD24:00/D2) durante las 4 semanas de experimento. Las barras indican los valores promedio y sus desviaciones estándar.

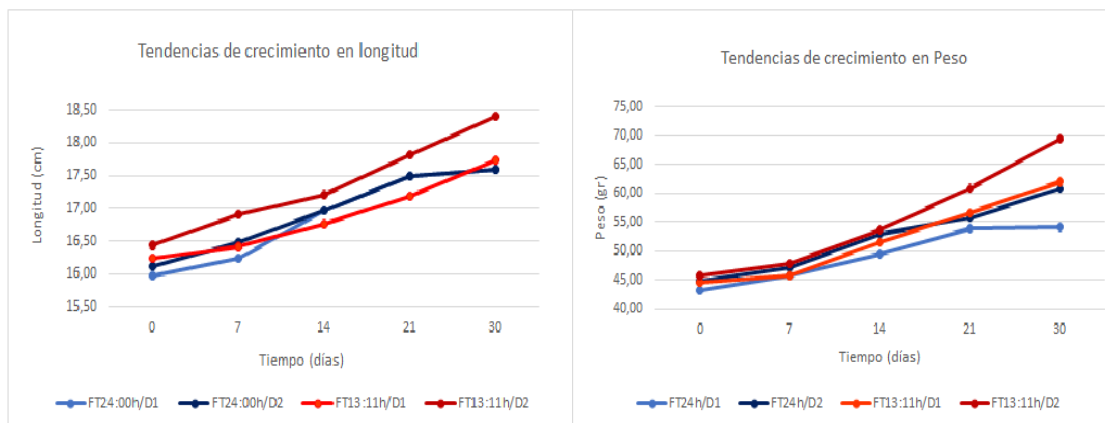


Figura N°8. A: Tendencia del Longitud (cm) y B: Peso(gr) del Salmon atlántico para los cuatro grupos estudiados desde el T-0 hasta T-30.

Los análisis estadísticos evaluaron el nivel de significancia de los datos corporales de los peces en estudio. Entre los estanques control 1(Fotoperiodo LD 24:0/D1) vs experimental 1 (Fotoperiodo LD 24h:0/D2) y control 2(Fotoperiodo LD 13:11/D1) vs experimental 2(Fotoperiodo 13:11/D2) utilizando en cada caso todos los datos registrados durante el experimento. Se encontró que estas diferencias de peso entre controles y experimentales no eran estadísticamente significativas, con un $P > 0,05$.

Sin embargo, las gráficas lineales de tendencias, tanto en longitud como en peso, se observa una tendencia de menor crecimiento para grupos con luz 24:00, fotoperiodo continuo.

3.2.2 Ganancias

Tabla N°3. Valores de ganancia longitud (cm) y peso (gr) para los cuatro grupos experimentales al final del experimento T=0.

	GRUPOS			
	FTLD24:00/D1	FTLD24:00/D2	FTLD13:11/D1	FTLD13:11/D2
Ganancia Longitud	1,62	1,48	1,49	1,96
Ganancia Peso	10,92	16,03	17,48	23,82

Se puede apreciar que el grupo de peces con mayor ganancia en longitud (1,93cm) y peso(23,82gr) fueron los sometidos a fotoperiodo LD 13:11/D2, mientras que los de menor ganancia en longitud (1,62) y peso (10,92) fueron los peces sometidos a fotoperiodo LD24:00/D1. Se encontró que estas diferencias de ganancia entre controles y experimentales no eran estadísticamente significativas, con un ($P > 0.05$).

3.2.3 Tasa específica de crecimiento (SGR).

Los grupos con luz continua LD24:00/D1 y LD24:00/D2 presentaron menores valores de SGR, (0,75,1,02) respecto a los grupos fotoperiodo LD13:11/D1 y LD13:11/D2 (1,10, 1,40). Se encontró que estas diferencias de SGR entre controles y experimentales no eran estadísticamente significativas, con un $P > 0,05$.

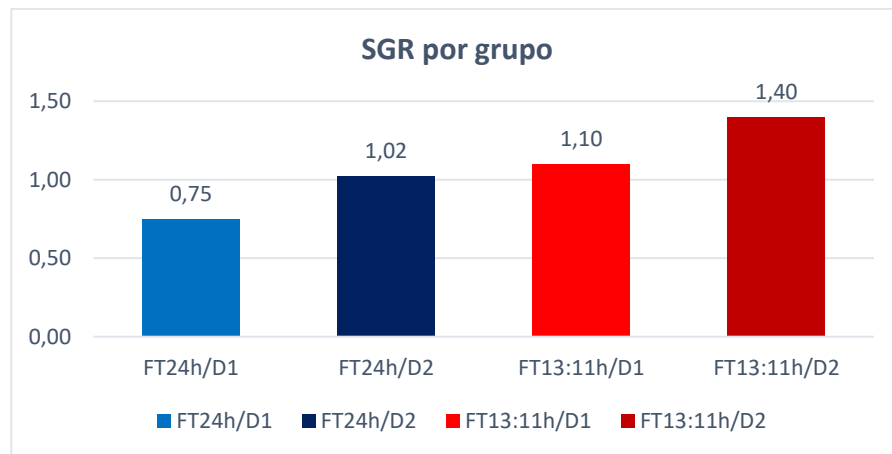


Gráfico N°9. Tasa específica de crecimiento (SGR) del peso corporal de *S. salar*, para los 30 días de tratamiento a fotoperiodo 24:00h y 13:11h.

3.2.4 Factor de condición (K)

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$) para los valores K obtenidos.

Tabla N°4. Valores del Factor de condición (K), semana tras semana en los estanques sometido a fotoperiodos LD 24:00/D1, LD24:00/D2 y fotoperiodo LD13:11/D1 y LD 13:11/D2.

FACTOR DE CONDICIÓN				
Tiempo (días)	FTLD24/D1	FTLD24/D2	FTLD13:11/D1	FTLD13:11/D2
0	1,0	1,0	1,1	1,1
7	1,0	1,0	1,1	1,1
14	1,1	1,1	1,0	1,1
21	1,1	1,1	1,0	1,0
30	1,1	1,1	1,0	1,1

Factor de conversión alimenticia (FCR)

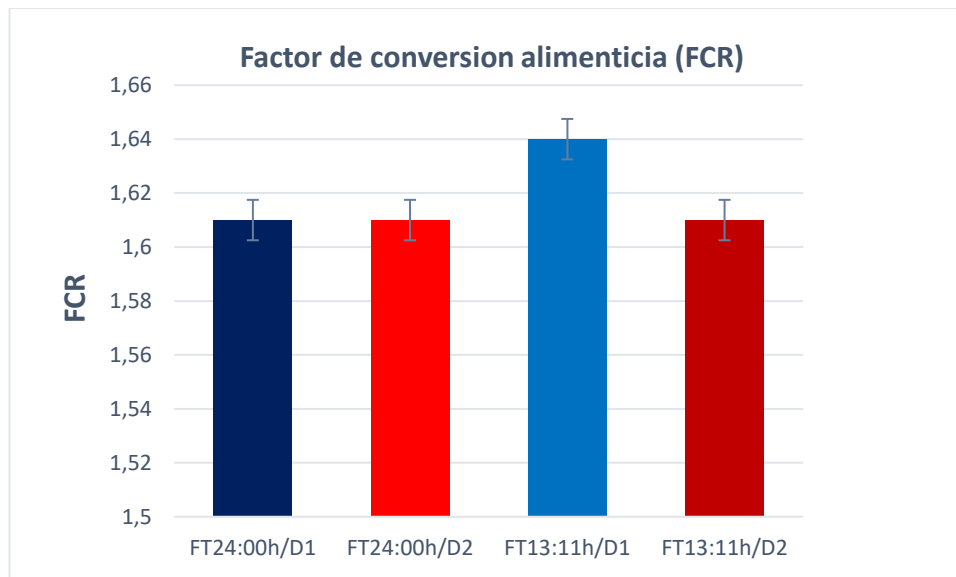


Figura N°10. FCR promedio para cada grupo sometido a experimento durante 30 días.

Se puede observar que los datos de FCR para los grupos sometidos tanto a luz continua LD24:0 como LD13:11 fueron similares. Los análisis estadísticos arrojaron que no hay diferencias significativas entre los grupos ($p > 0,05$)

Cuantificación de los niveles de expresión relativa de IGF-1 y GHR por qPCR-RT.

La expresión relativa de los genes para tiempo 1 y tiempo 2, se presentan como los valores de las medias de la expresión relativa de los genes objeto de estudio para cada grupo. Los datos corresponden a los estanques de los peces experimentales y del grupo control.

Los resultados de los análisis qPCR-RT obtenidos y los diversos cálculos realizados se resumen en (anexo1).

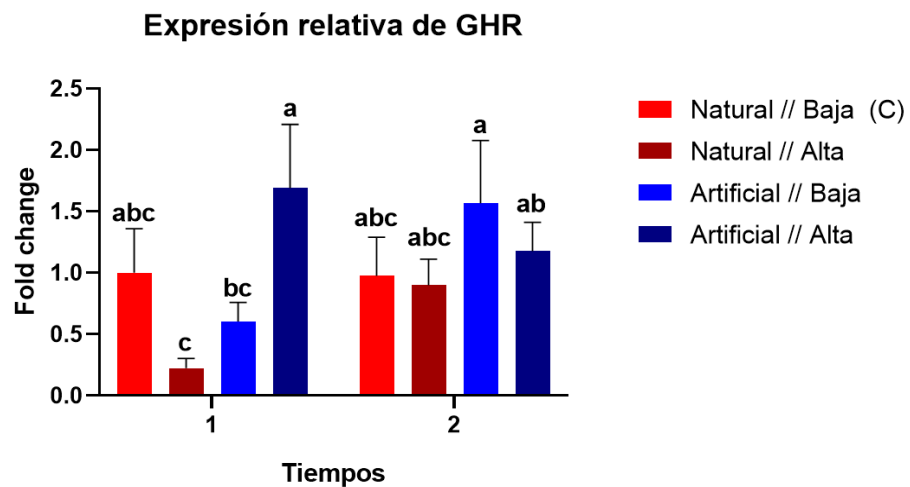


Figura N°11. Valores calculados de Fold Change para la expresión relativa de los genes GHR a T1 y T2, para los 4 grupos de estudio.

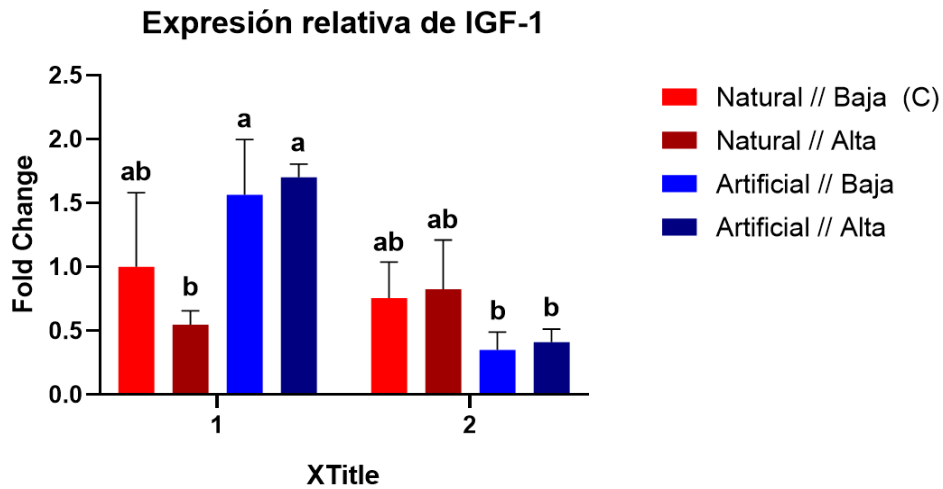


Figura N°12. Valores calculados de Fold Change para la expresión relativa de los genes IGF-1 a T1 y T2, para los 4 grupos de estudio.

La expresión relativa se analizó por los valores fold change determinados a partir de los valores de Q normalizados, tomando al grupo LD13:11DB como control (calibrador).

Los resultados de la qPCR-RT mostraron una buena eficiencia de amplificación para nuestros análisis con ausencia de productos amplificados en los controles negativos y buena especificidad de los partidores. No se detectó contaminación con trazas de ADN.

La expresión relativa del receptor GHR y el factor IGF-1 y fotoperiodo LD24:00 a tiempo T1 (día 14) y T2 (día 30) mostraron diferencias significativas respecto al control (LD13:11DB-T1). A tiempo T2, hubo una mayor expresión relativa de receptores GHR para grupos con LD24:00, y una menor expresión de IGF-1. También a tiempo T2, no se encontró evidencia significativa sobre la expresión de ambos genes debido a efectos de la densidad. A tiempo T1 se encontró una mayor expresión relativa de IGF-1, estadísticamente significativa, para los grupos con LD24:00, a ambas densidades; lo cual se revirtió a tiempo T2, también con diferencias estadísticamente significativas, donde hubo una mayor expresión de IGF-1 en grupos LD13:00. Tampoco se encontró a tiempo T2 evidencia estadística que indique un efecto de la densidad sobre las expresiones de los genes de interés, entre grupo control LD13:11DB y LD13:11DA. Lo que nos sugiere que las diferencias en la expresión de los genes GHR y IGF-1 al finalizar el experimento (tiempo T2), observada para los grupos con LD24:00 se debería al uso de fotoperiodo de luz continua. A tiempo T1 (día 14) la expresión relativa de IGF-1 fue mayor en grupos con

LD24:00 que grupos LD13:11, lo que se invirtió al día 30 (tiempo T2), donde los grupos LD24:00 mostraron menor expresión relativa de IGF-1 que el grupo control (LD13:11DB). Este comportamiento en el tiempo, de la expresión de IGF-1, podría ser explicado como efecto de procesos y mecanismos de respuestas celular, que se observan cuando se trabaja con organismos celulares vivos y dinámicos.

Discusión

Parámetros Biológicos

Crecimiento

El crecimiento es uno de los factores más importantes para la producción de peces. Los factores que influyen en el crecimiento son la temperatura, el oxígeno, y la cantidad de alimento (Blanco, 1994). Al analizar los resultados obtenidos a nivel biométrico (Longitud y peso) de juveniles de Salmon atlántico en el tiempo que duro el experimento, se observa que al final del ensayo (día 30) los peces sometidos a luz artificial continua LD 24:0 presentaron tendencia menor que los grupos con fotoperiodo natural simulado 13:11, tanto en longitud como en peso (GraficoN°1 y GraficoN°2). Para confirmar esta tendencia, habría que prolongar el periodo de experimentación, en un nuevo estudio, donde tiempos superiores a 30 días podrían entregar diferencias estadísticamente significativas en los datos biométricos, ya que publicaciones encontradas sobre el efecto del uso de luz continua sobre el crecimiento en alevines, concluyen, en general, que el uso de luz continua LD 24:00 favorece el crecimiento en peso y longitud, pero en un periodo de 16 meses (Shulgina NS et al.,2021).

Nuestra investigación estaría entregando indicios que el uso de luz continua en *S.salar* pre-smolt tendría un efecto contrario al observado en estudios previos en etapa de alevín (Shulgina NS et al.,2021) y de postsmolt (Oppedal et al., 1997; 1999), afectando negativamente el crecimiento, al menos en el periodo de tiempo utilizado en esta investigación (total de 30 días) por lo que su implementación no sería recomendable. Por ende, se requiere de más investigaciones para confirmar el posible efecto negativo sobre el crecimiento de esta especie de cultivo en esta etapa de su desarrollo.

Analizando el efecto de la densidad en situación de fotoperiodo 24:00 y 13:11, se encontró que, en ambos grupos, la densidad no tuvo el comportamiento esperado, como un factor negativo para el crecimiento. Esto pudo haber sido causado porque la densidad alta utilizada no fue lo suficientemente alta para *S.salar* presmolt de la talla y peso promedios (16,18 cm y 45gr) usados en el ensayo. Es importante tener en cuenta, sin embargo, que el salmón del Atlántico, utiliza su gran masa de músculo blanco como un acumulador de energía, para gastos metabólico y que la cantidad de grasa en el músculo de salmón bien alimentados aumenta con el tamaño del pez (stage.L,2010). Así, los peces de los estanques con fotoperiodo LD 24:00 estarían demandando un mayor consumo energético que los con fotoperiodo LD 13:11. Y este aporte energético pasa a ser un factor limitante si las raciones de alimento diario (1,5%) no alcanzan a cubrir dicho aumento de demanda energética.

Al analizar los resultados obtenidos en la tasa específica de crecimiento (SGR) del Salmon atlántico para cada grupo durante todo el tiempo que duró el experimento (Gráfico N°4), se observa que los grupos sometidos a fotoperiodo LD 24:0 presentaron las menores tasas de crecimiento. 0,75 para fotoperiodo LD 24:0/D1 y 1,02 para fotoperiodo LD 24:0/D2. Los grupos con fotoperiodo LD 13:11 mostraron una tasa de crecimiento mayor. Estos datos, de SGR, contrastan con lo reportado para *S. salar* en etapas de engorde, donde salmones postsmolt cultivados en estanques en tierra, con agua de mar (Saunders y Henderson, 1988; Kråkenes et al., 1991) y también en peces cultivados en balsas jaulas marinas (Oppedal et al., 1997; 1999); en donde peces expuestos a fotoperíodos artificiales largos durante el invierno y primavera, dieron como resultado un incremento en la tasa de crecimiento, lo cual pudo haber estado influenciado por el tiempo de experimento el cual duró 4 meses, % de alimentación y la etapa en la que se encontraban los peces(postsmolt).

El factor de condición de Fulton (K) expresa, la relación volumétrica en función del peso. Dicho factor puede indicar el estado nutritivo de los organismos y, en cultivo, es útil para comparar y cuantificar numéricamente la condición o estado en que el pez se encuentra, pudiendo asociarse a una valoración de la contextura o estado de delgadez o gordura. De este modo, un valor por debajo de 1 indicaría que los peces están más delgados en comparación con peces con un índice de 1 o más. Es decir, los peces de mayor peso a una determinada longitud, presentan una mejor condición (Froese, 2006). En el gráfico N°1 y gráfico N°2, se puede ver que tanto el peso corporal como la longitud de los individuos aumentó a medida que transcurrieron las semanas. Se obtuvo una buena relación longitud y peso, ya que, para los 4 grupos, controles y tratamientos, los valores de K promedio se situaron entre 1,00 a 1,10. Los valores de K, obtenidos en los estanques controles y experimentales representan peces que están siendo apropiadamente alimentados(Alvarado, 1998).

El factor de conversión alimenticia (FCR) expresa la relación entre el alimento (Kg) entregado durante un periodo de tiempo y el incremento biomasa (kg) durante ese mismo periodo de tiempo. Este factor puede indicar que cuanto menor sea el FCR, mayor será la eficiencia del uso de alimento, los FCR obtenidos en esta investigación arrojan datos estadísticamente no significativos ($p > 0.05$). Al no existir diferencias significativas se deduce que el desempeño de los peces al convertir alimento en masa corporal, fue muy similar (1,61-1,64) y eso se refleja en la gráfica N°4.

La optimización de las concentraciones de ADNc a utilizar fue obtenida, para todos los genes que fueron sometidos a evaluación mediante la amplificación utilizando una curva de diluciones de ADNc sintetizado a partir del ARN proveniente de tejido muscular de

Salmon atlántico. Esta curva estándar de diluciones seriadas permitió definir el rango óptimo de concentraciones de la muestra y se determinó la eficiencia. Las eficiencias de la PCR en tiempo real se calculan a partir de las pendientes de la curva estándar obtenidas después de realizar diluciones seriadas con las reacciones de la PCR en tiempo real (Pfaffl, 2004). Es importante mencionar que la eficiencia de la PCR en tiempo real es la capacidad de la reacción de duplicar el número de copias de las cadenas de ADN o ADNc en cada ciclo (Bustin & Nolan, 2004). Para el caso de los normalizadores 18 s y E α -1, se obtuvo como resultado una curva de diluciones con una eficiencia de 108% y 120%. En teoría la eficiencia de la PCR debería ser de aprox.90-100% (pendiente ideal = 3.32). Sin embargo, existen diversos factores que pueden afectar la eficiencia, tales como; el largo del amplicón, la estructura secundaria y el diseño de primers, entre otros (Edwards,2004). Las concentraciones iniciales de las muestras, para el gen GHR e IGF-1, fue de 50ng/ μ L de ADNc debido a que amplificaba bien el gen. Cabe decir, que a esta concentración no se presentó contaminación con dímeros de partidores.

GHR es el receptor para la hormona del crecimiento (GH) y su función es traducir la señal para el crecimiento. La mayor expresión relativa de GHR encontrada a tiempo T1 fue para el grupo con fotoperiodo LD 24:00/D2 y para T2 el fotoperiodo LD 24:00h/D1. Puesto que biométricamente los peces del grupo LD 24:00 crecieron menos que los peces con fotoperiodo LD 13:11 (grafico N°1 y graficoN°2), la mayor expresión del receptor GHR encontrada en peces bajo fotoperiodo LD 24:00 reflejaría una respuesta celular de tipo compensatoria, tras detectar alguna señal molecular que interfiere con el crecimiento normal. Es decir, la aplicación de LD 24:00 por 30 días, en peces pre-smolt, inhibe su crecimiento y esta inhibición es detectada por la célula y responde con una mayor síntesis de GHR, para favorecer el crecimiento y compensar los efectos inhibitorios del Fotoperiodo continuo por 30 días. Puesto que esto fue observado en grupos con densidad baja como alta, sería el efecto de alteración del fotoperiodo el responsable de los cambios en la expresión génica del GHR.

IGF-1 es un factor activador del crecimiento. La expresión relativa de IGF-1 fue superior para los grupos con fotoperiodo LD 13:11. En el tiempo T2, al finalizar el experimento, los fotoperiodos LD 13:11/D1 y LD 13:11/D2 fueron superiores a los valores obtenidos para grupos con fotoperiodo LD 24:00/D1 y LD 24:00/D2. Los datos obtenidos para el factor IGF-1 (activador del crecimiento) son concordante con los análisis biométricos obtenidos, donde los grupos con fotoperiodo presentaron mayor crecimiento al finalizar el ensayo. Estos resultados de expresión relativa de IGF-1 indican que el fotoperiodo LD 24:00h (aplicación de luz continua) ejerce un efecto inhibitorio sobre la expresión génica de IGF-1 tanto al día 14 como al día 30 de ensayo.

La expresión de IGF-1 son gatillados por la GH cuando se une a su receptor GHR. Esto estaría confirmando que el fotoperiodo LD 24:00h por 30 días en peces pre-smolt inhibiría la síntesis de este factor y la célula tendría la capacidad de detectar esta disminución de IGF-1, la trataría de compensar aumentando la síntesis de receptores GHR, necesarios para la expresión de IGF-1.

CONCLUSIONES

- 1.- La aplicación de fotoperiodo continuo por un periodo de 30 días, en peces *S. salar* en etapa pre-smolt, afecta el crecimiento de los peces de forma negativa, retardando su crecimiento tanto en longitud como en peso,
- 2.- Este efecto se refleja a nivel molecular, en el tejido muscular, con cambios en los niveles de expresión génica de genes que codifican proteínas y factores implicadas en los procesos moleculares del crecimiento en el tejido muscular de *Salmo salar*.
- 3.- Lo reportado para juveniles *S.salar* en etapa post-smolt, difiere de lo encontrado en este trabajo, por lo que la aplicación de fotoperiodo continuo no tendría los mismos efectos en peces pre-smolt que peces en etapa post-smolt. Sin embargo, hay que considerar la posibilidad que, a tiempos mayores de lo realizado en este ensayo, los efectos, bajo las mismas condiciones de luz continua, puedan ser revertidos, como consecuencia de los procesos de adaptabilidad celular. Para contar con conclusiones más certeras, es necesario confirmar estos resultados con nuevas investigaciones que considere periodos de estudio mayores.
- 4.- La baja en el crecimiento para peces pre.smolt cultivados con fotoperiodo artificial 24:00 por 30 días, sería por una posible inhibición sobre la expresión de IGF-1 como consecuencia de la aplicación de luz continua. Y el aumento de GHR en estos individuos sería el mecanismo compensatorio del tejido muscular. Dado el complejo mecanismo molecular que regula la proliferación celular, los efectos del uso de luz artificial 24:00 debe incidir sobre diversas moléculas y varios caminos de traducción de señales, que incluyen algunas moléculas activadoras y otras inhibitorias para el crecimiento.

LITERATURA CITADA

- Alvarado, R.M.E. (1998), La concepción de la ciencia en la UNAM. Su enseñanza, Tesis de Maestría, México, UNAM-Facultad de Filosofía y Letras, División de Posgrado
- Bailey Burgess P. 2000. Tropical Fish Iopaedia. A Complete guide to fish care. Howell Book House, New York.
- Beckman, B.R., 2011. Perspectives on concordant and discordant relations between insulin-like growth factor 1 (IGF1) and growth in fishes. *General and Comparative Endocrinology*, 170(2), pp.233-252.
- Boujard, T., Gelineau, A. y Corraze, G., (1995). Time of a single daily meal influences growth performance in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*. 26:341-349.
- Blanco, C.M. (1995). La trucha, cría industrial, Segunda Edición, Ediciones Mundi Prensa Madrid España
- Chang, JP y Wong, AOL. 2009. Growth Hormone Regulation in Fish: A Multifactorial Model with Hypothalamic, Peripheral and Local Autocrine/Paracrine Signals. p. 151-195. En: Bernier NJ, GVD Kraak, AP Farrel and CJ Brauner (Eds.). *Fish Neuroendocrinology*. Academic Press, London, 529p.
- Froese, r. 2006. Cube law, condition factor and weight-length relationships: history, meta-analysis and recommendations. *Journal of Applied Ichthyology* 22:241-253.
- FAO 2011. El estado mundial de la pesca y acuicultura
- FAO 2014. El estado mundial de la pesca y acuicultura.
- FAO 2016. El estado mundial de la pesca y acuicultura.
- Imsland, A., Folkvord, A.F., Steffansson, S.O., (1995). Growth, oxygen consumption and activity of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) reared under different temperatures and photoperiods. *Neth. J. Sea Res.* 34:149–159
- IT'SNature.2009. <https://www.inaturalist.org/taxa/48648-Salmo-salar>
- Katz, J., Iizuka, M. & Muñoz, S. (2011). Creciendo en base a los recursos naturales, «tragedia de los comunes» y futuro de la industria salmonera chilena. *cepal - Serie desarrollo productivo*, (191), 1-95.
- Kråkenes, R., Hansen, T., Stefansson, SO y Taranger, GL (1991). La luz continua aumenta la tasa de crecimiento del salmón del Atlántico (*Salmo salar* L.) después de la muda en jaulas marinas. *Acuicultura* , 95 (3-4), 281-287.

- Le Roith, D., Bondy, C., Yakar, S., Liu, J.L., Butler, A., 2001. The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocrine Reviews*, 22(1), pp.53-74
- Martinelli, S. G., Radünz Neto, J., Silva, L. P. D., Bergamin, G. T., Maschio, D., Flora, M. A. L. D., ... & Possani, G. (2013). Densidade de estocagem e frequência alimentar no cultivo de jundiá em tanques-rede. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 48, 871-877. Martinelli, S. G., Radünz Neto, J., Silva, L. P. D., Bergamin, G. T., Maschio, D., Flora, M. A. L. D., ... & Possani, G. (2013). Densidade de estocagem e frequência alimentar no cultivo de jundiá em tanques-rede. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 48, 871-877.
- Mommsen, T.P., 2001. Paradigms of growth in fish. *Comparative biochemistry and physiology part B: Biochemistry and molecular biology*, 129(2), pp.207-219.
- Oppedal F, Taranger GL, Juell JE, Hansen T (1999) Crecimiento, osmorregulación y maduración sexual de los menores de un año Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) expuesto a diferentes intensidades ent de luz continua en jaulas marinas. *Acuicultura Resolución* 30:491-499.
- Oppedal F, Juell JE, Taranger GL, Hansen T (2001) Artificial la luz y la estación afecta la distribución vertical y la natación. comportamiento de apareamiento del salmón atlántico post-smolt en el mar jaulas J Fish Biol 58:1570-1584
- Paul N De Ionno, A Graeme, L Wines. 2006. A bioeconomic evaluation of a commercial scale recirculating finfish, *Aquaculture* nº 259.
- Pierce, A.L., Breves, J.P., Moriyama, S., Hirano, T. y Grau, E.G. 2011. Differential regulation of Igf1 and Igf2 mRNA levels in tilapia hepatocytes: effects of insulin and cortisol on GH sensitivity. *Journal of endocrinology*, 211: 201-210p.
- Pierce, A.L., Breves, J.P., Moriyama, S., Uchida, K. y Grau, E.G. 2012. Regulation of growth hormone (GH) receptor (GHR1 and GHR2) m RNA level by GH and metabolic hormones in primary cultured tilapia hepatocytes. *General and comparative endocrinology*, 179: 22-29p.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9):e45.
- Poblete Abuter, E. (2010). Análisis de la expresión de genes implicados en el crecimiento muscular del lenguado chileno (*paralichthys adspersus*): efecto de la restricción nutricional y el crecimiento compensatorio.
- Saunders, R.L. and Harmon, P.R., 1988. Extended daylength increases postsmolt growth of Atlantic salmon. *World Aquacult.*, 19(4): 72-73.
- Sánchez, C. (1999) Utilización del fotoperíodo en la producción de smolts S0 de salmón del atlántico (*Salmo salar*) (Linnaeus, 1758), criados en agua dulce y en

ambiente estuarino. Tesis, Esc. de Biología Marina, Fac. de Ciencias, Univ. Austral de Chile, 66 pp.

- Shulgina, NS, Churova, MV, Murzina, SA, Krupnova, MY y Nemova, NN (2021). El efecto de la luz continua sobre el crecimiento y la expresión génica específica del músculo en salmones del Atlántico (*Salmo salar* L.) de un año. *Vida*, 11 (4), 328.
- Thorpe, J. E.1986. Age at first maturity in atlantics salmon (*Salmo salar*): freshwater period influences and conflicts with smolting. En: *Salmonid age at maturity* (Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci), 89: 7-14. Department of fisheries and Oceans, Ottawa, Canadá.
- TIMMONS M, EBELING J, MHEATON F, SUMMERFELT S & VINVI B. 2002. *Recirculation aquaculture Sistem*. 2 editions. 213 pp.
- Thorpe, J. E.1986. Age at first maturity in atlantics salmon (*Salmo salar*): freshwater period influences and conflicts with smolting. En: *Salmonid age at maturity* (Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci), 89: 7-14. Department of fisheries and Oceans, Ottawa, Canadá.
- Valenzuela, CA, Escobar, D., Pérez, L., Zuloaga, R., Estrada, JM, Mercado, L., ... & Molina, A. (2015). Dinámica transcripcional de genes relacionados con la inmunidad, el crecimiento y el estrés en el músculo esquelético de la platija fina (*Paralichthys adpersus*) durante diferentes estados nutricionales. *Inmunología comparativa y del desarrollo*, 53 (1), 145-157.