



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
Y OCEANOGRÁFICAS**



**EVALUACIÓN DE EFECTOS DEL FOTOPERÍODO ARTIFICIAL EN
LA HEMATOPOYESIS DEL SALMÓN DEL ATLÁNTICO *Salmo salar***

Paulina Esperanza Bustos Panes

Seminario de Título presentado al
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFÍA
DE LA UNIVERSIDAD DE CONCEPCION

Para optar al Título de
BIÓLOGA MARINA

Concepción – Chile

11 de Agosto, 2025

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFIA

Este Seminario de Título ha sido realizado en el Laboratorio de Piscicultura y Patología Acuática perteneciente al Departamento de Oceanografía de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas y el Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos perteneciente al Departamento de Fisiopatología en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción.

Profesor Guía

Dr. Ariel Valenzuela Saldías
Departamento de Oceanografía
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

Profesora Co Guía

Dra. Jannel Acosta Alba
Departamento de Fisiopatología
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Comisión evaluadora

Dr. Fernando Cruzat Cruzat
Departamento de Oceanografía
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

Dr. Sebastián Escobar Aguirre
Facultad de Agronomía y Sistemas Naturales
Pontificia Universidad Católica de Chile

Coordinador
Seminario de Título

Dr. Eduardo Hernández
Departamento de Oceanografía
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero dar gracias a mi profesor guía el Dr. Ariel Valenzuela por darme la oportunidad de entrar al equipo del Laboratorio de Piscicultura y Patología Acuática, por creer en mí, escucharme y por permitirme crecer bajo su cuidado y tener una paciencia que ni yo misma tengo conmigo.

Del mismo modo agradezco inmensamente al personal del LPPA:

A Jorge, por acompañarme y ayudarme con todo el trabajo que implica el mantenimiento de los peces, por estar para mí cada vez que estuve en un apuro.

A Alberto, que además de convertirse mi amigo me enseñó enérgicamente todo lo que le preguntaba, potenciando mi entusiasmo por la ciencia.

Y por sobre todo le agradezco a Niza, que siempre me acompañó y guió en el proceso, por cada muestreo en que me ayudó, por dejarme contar con ella y por confiar en mí como estudiante, como profesional y como persona.

A la Dra. Jannel Acosta por disponerme de los recursos y el conocimiento para trabajar en un área completamente nueva y por su infinita paciencia con mi proceso de aprendizaje. A Crisleri, por tener la disposición de enseñarme incluso cuando estábamos contra el tiempo.

Y a Amon, por la compañía, la tranquilidad y el calor que me dio todas las noches de desvelo durante mis últimos años de carrera.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
INDICE DE FIGURAS.....	VIII
INDICE DE ANEXOS	IX
RESUMEN.....	X
ABSTRACT.....	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 La industria acuícola en la actualidad (Contexto acuícola mundial y nacional)1	
1.2 Uso de fotoperiodo artificial en la salmonicultura y su efecto en la 3	
fisiología de teleósteos	3
1.3 Hematopoyesis en teleósteos.....	6
2. HIPÓTESIS	10
3. OBJETIVOS.....	11
3.1 Objetivo general:.....	11
3.2 Objetivos específicos:	11
4. MATERIALES Y MÉTODOS	12
4.1 Peces	12
4.2 Diseño experimental.....	13
4.2.1 Instalación de luces	14
4.2.2 Muestreos	16
4.3 Índices de crecimiento.....	17
4.3.1 Porcentaje de ganancia de peso	17
4.3.2 Factor de Conversión de Alimento FCR	17
4.3.3 Tasa Específica de Crecimiento SGR	17

4.3.4 Factor de condición	18
4.4 Procesamiento de muestras para análisis molecular	18
4.4.1 Extracción y purificación de ARN	18
4.4.2 Cuantificación e integridad del ARN	18
4.4.3 Síntesis de cDNA y prueba de partidores.....	19
4.5 RT-qPCR	20
4.5.1 Rango dinámico.....	20
4.6 Análisis estadístico expresión génica	23
4.7 Declaración de bienestar animal.....	24
5. RESULTADOS.....	25
5.1 Efecto de los distintos fotoperíodos en el crecimiento.....	25
5.1.1 Ganancia de peso	25
5.1.2 Factor de conversión de alimento (FCR)	27
5.1.3 Factor de condición	27
5.2 Cuantificación de la expresión génica por RT-qPCR.....	28
5.2.1 Prueba de partidores	28
5.2.2 Eritropoyesis.....	29
5.2.3 Mielopoyesis	31
6. DISCUSIÓN	33
7. CONCLUSIONES.....	43
BIBLIOGRAFÍA.....	44
ANEXOS	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de partidores utilizados.....	19
Tabla 2. Valores de eficiencia de cada par de partidores obtenidos mediante rango dinámico.....	21
Tabla 3. Ganancia de peso (%) y tasa específica de crecimiento (SGR) para los tres fotoperíodos del T0 (día 1) al T1 (día 45).....	25
Tabla 4. Ganancia de peso (%) y tasa específica de crecimiento (SGR) para los tres fotoperíodos desde el T1 (día 45) al T2 (día 60).....	26
Tabla 5. Factor de conversión de alimento para los tres fotoperíodos del T0 (día 1) al T1 (día 45).....	27

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción pesquera y acuícola mundial hasta el año 2022	2
Figura 2. Aplicación de luces de fotoperíodo diseñada para un tanque de peces	3
Figura 3. Los distintos tipos celulares del epitelio pineal	4
Figura 4. Proceso de diferenciación en la hematopoyesis definitiva de <i>Larimichthys crocea</i>	7
Figura 5. Esquema sobre ilustración de <i>Salmo salar</i> indicando órganos y tejidos principales de expresión de los genes de interés	9
Figura 6. Distribución de horas de luz durante el período de aclimatación.....	12
Figura 7. Representación esquemática del diseño experimental.....	13
Figura 8. Disposición de estanques para la aplicación de fotoperíodo artificial.....	14
Figura 9. Parámetros y espectro entregados por el espectrómetro para la luz a ras de techo de la unidad experimental, y dentro de cada estanque aislado para fotoperíodo ..	15
Figura 10. Ilustración esquemática de diferentes ubicaciones para toma de muestras de sangre de peces.....	16
Figura 11. Perfil termal utilizado en las reacciones de RT-qPCR para las muestras de los grupos de fotoperíodo.....	21
Figura 12. Perfil termal utilizado para las reacciones correspondientes a la elaboración de rango dinámico de partidores	22
Figura 13. Aumento de peso de los grupos LD24:0, LD 12:12 y LD 14:10	26
Figura 14. Factor de condición (K) de los tres grupos de estudio con datos recolectados el último día de fotoperíodo (T1, día 45)	27
Figura 15. Electroforesis en gel sembrado con el producto amplificado de PCR para muestras estándar con los partidores para GATA1 y EPO	28
Figura 16. Electroforesis en gel sembrado con el producto amplificado de PCR para muestras estándar con los partidores para PU.1 y CSF1R.....	28
Figura 17. Expresión relativa del factor de transcripción GATA1	29
Figura 18. Expresión relativa de la hormona glicoproteica eritropoyetina (EPO)	30
Figura 19. Expresión relativa del factor de transcripción PU.1	31
Figura 20. Expresión relativa del receptor del factor estimulante de colonias 1	32

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1 Protocolo extracción de ARN con reactivo TRIzol.....	50
ANEXO 2 Concentraciones obtenidas del aislamiento de ARN a partir de tejido de riñón anterior	51
ANEXO 3 Gel de agarosa para evaluación de integridad de ARN	52
ANEXO 4 Protocolo DNAsa I de New England Biolabs	53
ANEXO 5 Protocolo para RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit.....	54
ANEXO 6 Protocolo de PCR convencional	55
ANEXO 7 Protocolo RT-qPCR para Brilliant II SYBR® Green qPCR Master Mix	57
ANEXO 8 Curvas de rango dinámico	58

RESUMEN

El fotoperíodo artificial, basado en la manipulación de los ciclos de luz y oscuridad, es una herramienta ampliamente utilizada en el cultivo de peces para optimizar procesos como el crecimiento, la smoltificación, la maduración y el desove. Sin embargo, aún se desconoce cómo una exposición prolongada a estas condiciones puede afectar procesos fisiológicos claves en cada etapa del desarrollo. En este contexto, la hematopoyesis, responsable de la producción de células sanguíneas, representa un buen indicador del estado fisiológico general del pez, ya que se encuentra estrechamente ligada a funciones como el transporte de oxígeno, la respuesta inmune y el metabolismo. Dado que este proceso es sensible a factores ambientales, se espera que la exposición a fotoperíodos artificiales produzca cambios en la expresión génica de los reguladores hematopoyéticos.

Este estudio evaluó el efecto de diferentes regímenes de fotoperíodo artificial LD 24:0, LD 12:12 y LD 14:10 sobre la hematopoyesis de juveniles de *Salmo salar*. Se cuantificó mediante RT-qPCR la expresión relativa de genes asociados a la eritropoyesis y mielopoyesis (GATA1, EPO, PU.1 y CSF1R) a partir de tejido de riñón anterior, principal órgano hematopoyético en peces.

Los resultados indicaron que la expresión de GATA1 y EPO se incrementó transitoriamente a los 45 días de exposición, lo que sugiere una activación inicial del sistema eritropoyético como respuesta adaptativa a las nuevas condiciones de luz. En tanto, la expresión de PU.1 se mantuvo elevada bajo los fotoperíodos LD 24:0 y LD 14:10 lo que podría indicar una activación persistente del sistema mielóide. CSF1R, en cambio, mostró menor variación, pero reflejó un patrón de activación temprana.

Este trabajo aporta evidencia sobre cómo el fotoperíodo artificial puede modular procesos hematopoyéticos en peces, influyendo en su respuesta inmune y eficiencia metabólica, Comprender estos efectos es clave tanto para optimizar la producción en cultivo como para avanzar en el conocimiento ecofisiológico de especies de importancia comercial como *Salmo salar*.

ABSTRACT

Artificial photoperiod, based on the manipulation of light and dark cycles, is a widely used tool in fish farming to optimize processes such as growth, smoltification, maturation, and spawning. However, it is still unknown how prolonged exposure to these conditions may affect key physiological processes at each developmental stage. In this context, hematopoiesis, responsible for the production of blood cells, represents a good indicator of the general physiological status of the fish, as it is closely linked to functions such as oxygen transport, immune response, and metabolism. Since this process is sensitive to environmental factors, it is expected that exposure to artificial photoperiods will produce changes in the gene expression of hematopoietic regulators.

This study evaluated the effect of different artificial photoperiod regimes (LD 24:0, LD 12:12, and LD 14:10) on the hematopoiesis of juvenile *Salmo salar*. The relative expression of genes associated with erythropoiesis and myelopoiesis (GATA1, EPO, PU.1, and CSF1R) was quantified by RT-qPCR from anterior kidney tissue, the main hematopoietic organ in fish.

The results indicated that GATA1 and EPO expression increased transiently after 45 days of exposure, suggesting an initial activation of the erythropoietic system as an adaptive response to the new light conditions. Meanwhile, PU.1 expression remained elevated under the LD 24:0 and LD 14:10 photoperiods, which may indicate a persistent activation of the myeloid system. CSF1R, on the other hand, showed less variation but reflected an early activation pattern.

This work provides evidence on how artificial photoperiods can modulate hematopoietic processes in fish, influencing their immune response and metabolic efficiency. Understanding these effects is key both for optimizing production in aquaculture and for advancing the eco-physiological knowledge of commercially important species such as *Salmo salar*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La industria acuícola en la actualidad (Contexto acuícola mundial y nacional)

La acuicultura es definida como “el cultivo de organismos acuáticos, incluyendo peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas, que implica la intervención del hombre en el proceso de cría para aumentar la producción, en operaciones como la siembra, la alimentación, la protección de los depredadores, etc.” (FAO, 2024), es una actividad que se remonta a la antigüedad y ha sido crucial para el desarrollo de diversas culturas. Hoy, esta actividad ha evolucionado hasta convertirse en una de las industrias alimentarias de más rápido crecimiento a nivel global, cobrando especial relevancia ante el aumento de la demanda mundial de proteínas de origen acuático y las limitaciones que enfrenta la pesca extractiva, como la sobrepesca, el cambio climático y la degradación del ambiente marino (Henchion et al., 2017).

En este contexto, la acuicultura ha pasado a ser una fuente estratégica de abastecimiento alimentario. Según el informe SOFIA 2024 de la FAO, el año 2022 se concretó el hito en que la producción acuícola de animales acuáticos superó la producción de la pesca de captura, la cual se ha mantenido relativamente estable desde finales de la década de 1980, a diferencia de la acuicultura que ha aumentado significativamente durante el mismo período (Figura 1). Esta diferencia se ha observado durante años en varios países, consolidando esta actividad como un pilar de la seguridad alimentaria a nivel mundial. Este crecimiento sostenido ha impulsado el desarrollo de marcos regulatorios, tecnologías de cultivo y políticas de sostenibilidad en distintos países (Naylor et al., 2021; Tveterås et al., 2023).

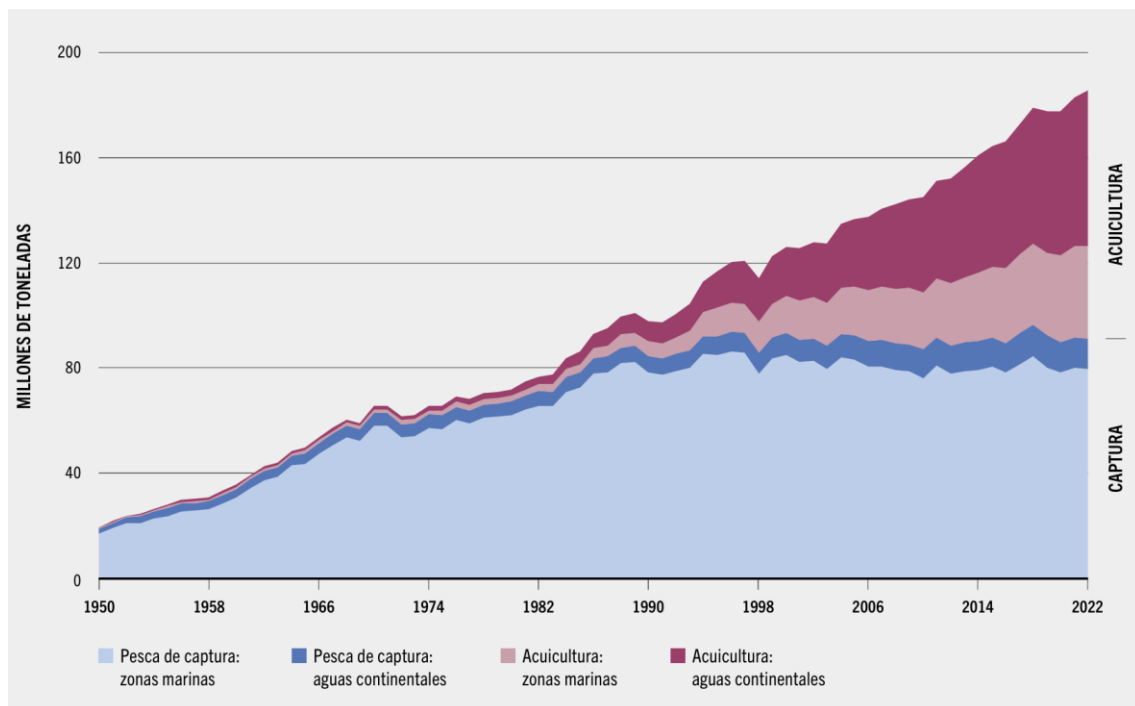


Figura 1. Producción pesquera y acuícola mundial hasta el año 2022 (FAO, 2024).

Chile es uno de los países donde esta expansión ha tenido un impacto más notable. La cría de salmónidos, en particular, ha posicionado a la acuicultura como una de las principales actividades económicas del país, tanto por su valor comercial como por el conocimiento científico que se ha generado en torno a estas especies. Actualmente, los salmónidos siguen siendo las especies más valoradas y exportadas (FAO, 2024) y su cultivo ha impulsado avances en manejo, nutrición y salud de peces en todas sus etapas de vida, los que se ven reflejados en manuales sanitarios y programas de fiscalización (SERNAPESCA, 2019, 2020). Las regiones de Los Lagos, Aysén y Magallanes concentran la mayor parte de esta producción, que alcanzó 998.317 toneladas en cosecha de salmónidos durante el año 2024 (SUBPESCA, 2025), que mantendría a Chile como el segundo mayor productor mundial después de Noruega (FAO, 2024). Esta industria enfrenta actualmente desafíos vinculados a la bioseguridad, el desarrollo tecnológico, el uso responsable de antimicrobianos, el bienestar animal y la aceptación social, además de la necesidad constante de optimizar más los procesos productivos.

1.2 Uso de fotoperíodo artificial en la salmonicultura y su efecto en la fisiología de teleósteos

El fotoperíodo es una señal ambiental clave que regula procesos biológicos estacionales a través del ritmo circadiano. Su influencia se ha observado en múltiples organismos como aves, mamíferos y plantas, afectando funciones como la reproducción, el crecimiento y los hábitos migratorios (Zhang et al., 2024).

El conocimiento acumulado sobre los efectos del fotoperíodo en todo tipo de organismos ha permitido desarrollar su manipulación artificial como herramienta tecnológica. En el ámbito agrícola, por ejemplo, la modificación del ciclo luz-oscuridad ha demostrado regular la expresión génica y el metabolismo en plantas, induciendo procesos como la floración o el crecimiento, según las necesidades de cultivo (Li et al., 2016; Osnato et al., 2022). Este conocimiento ha sido progresivamente trasladado al manejo animal, particularmente en especies acuáticas de interés comercial (Figura 2), dado que su aplicación permite sincronizar procesos fisiológicos clave con los objetivos de producción (Ytrestøyl et al., 2023; Pino Martinez et al., 2023; Biswas et al., 2005; Li et al., 2021).

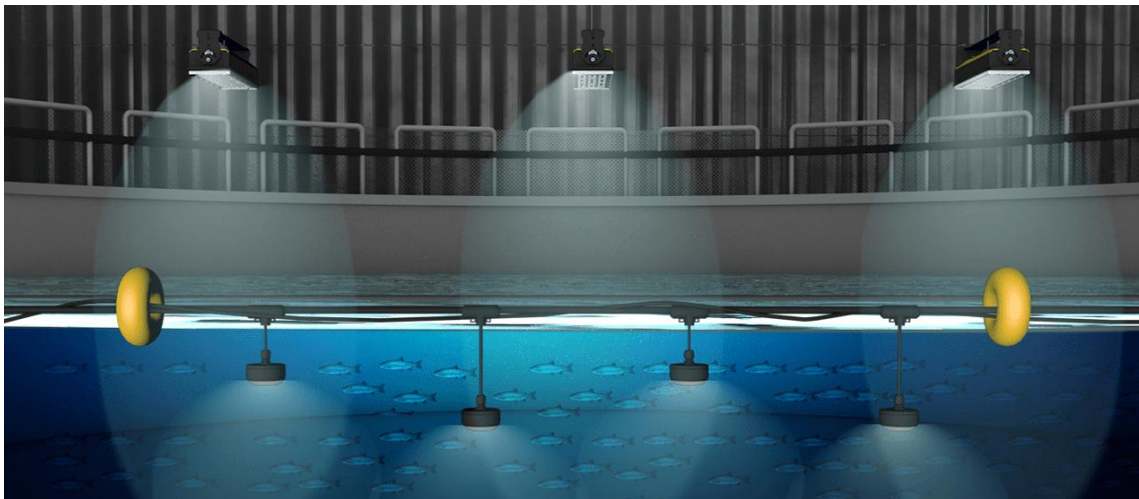


Figura 2. Aplicación de luces de fotoperíodo diseñada para un tanque de peces. (Imagen tomada de EVOLUX)

La percepción del fotoperíodo en los peces ocurre principalmente a través de la retina de los ojos y la glándula pineal. Esta última se origina como una evaginación del diencéfalo, y su tejido funcional está compuesto por tres tipos principales de células: fotorreceptoras, neuronas y células gliales o intersticiales (Figura 3). Las células fotorreceptoras pineales se asemejan estructuralmente a los conos de la retina de los vertebrados, funcionando como sensores de luz (Falcón, 1999). En ellas, los estímulos lumínicos se traducen en señales neuronales u hormonales, principalmente a través de la secreción de melatonina (Maitra et al., 2012). Aunque los ojos participan en la detección de luz, se ha sugerido que no tienen un rol directo en la regulación de la producción de melatonina pineal (Vera et al., 2010), por lo que la glándula pineal actuaría como el principal y predominante fotorreceptor involucrado en la percepción del fotoperíodo que influye en su síntesis.

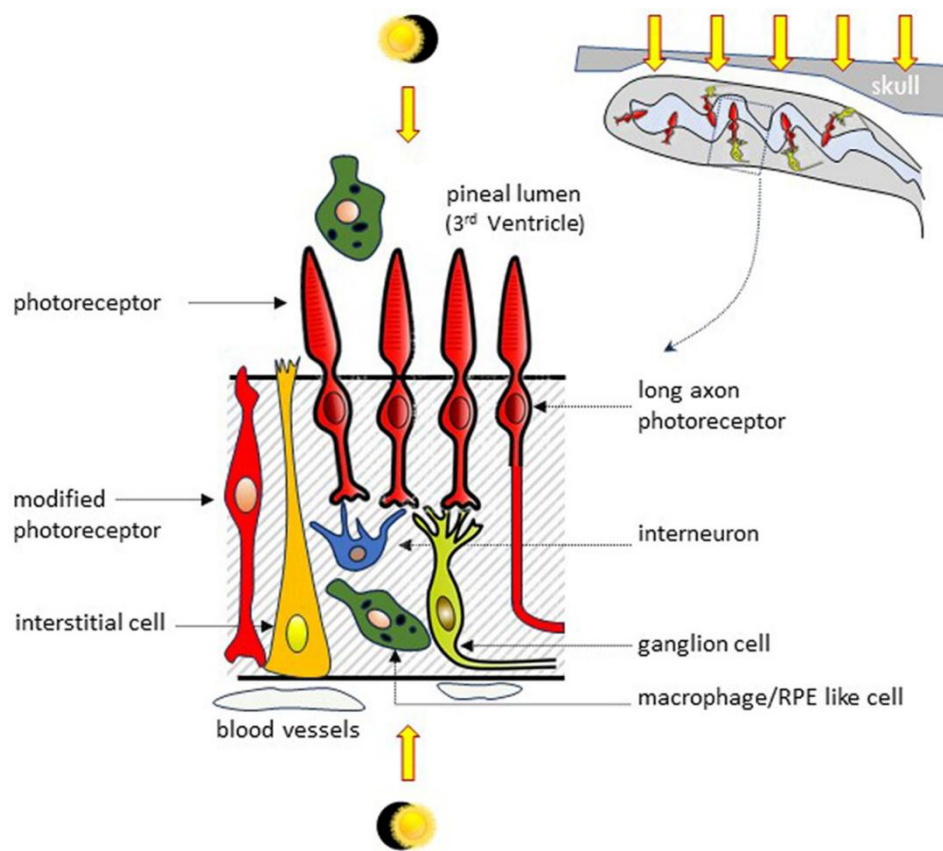


Figura 3. Los distintos tipos celulares del epitelio pineal. Las flechas muestran las direcciones de la entrada de luz sobre estas células, según su posición en el epitelio (Falcón & Muñoz-Cueto, 2024)

Este mecanismo neuroendocrino es aprovechado en el manejo de especies acuícolas, permitiendo manipular procesos fisiológicos clave, como el crecimiento y la engorda, la inducción fuera de época de la smoltificación, o la sincronización de los desoves según necesidades productivas (Al-Emran et al., 2024; Pino Martinez et al., 2023; Ytrestøyl et al., 2023).

Aunque el fotoperíodo artificial se ha utilizado exitosamente como herramienta de manejo productivo en la salmonicultura, los estudios sobre sus posibles efectos adversos a nivel fisiológico son aún limitados. Se ha propuesto que la exposición prolongada a luz continua podría inducir un estado de estrés crónico en los peces, activando de forma sostenida el eje hipotálamo–hipófisis–interrenal (Valenzuela et al., 2006). Además, la melatonina —cuyo ritmo de secreción se ve alterado por estas condiciones— podría tener un rol modulador sobre la respuesta inmune, sugiriendo que la manipulación del ciclo luz-oscuridad impacta no solo en la reproducción y el crecimiento, sino también en la inmunocompetencia de los individuos (Esteban et al., 2006), aspectos que radican directamente en el proceso y los órganos encargados de la producción de estas células inmunes y células con funciones respiratorias y hemostáticas, la hematopoyesis.

1.3 Hematopoyesis en teleósteos

La hematopoyesis es el proceso dinámico de formación y renovación continua de células sanguíneas, el cual se ajusta a las demandas fisiológicas del organismo. Este proceso se basa en la actividad de las células madre hematopoyéticas, caracterizadas por su capacidad de autorrenovación, capaces de generar dos células troncales, y por su potencial de diferenciación hacia todos los linajes sanguíneos maduros (Hoggatt & Pelus, 2013). Estas propiedades permiten mantener el equilibrio entre la producción basal de células sanguíneas y las necesidades específicas del organismo, tanto en condiciones normales como ante desafíos fisiológicos.

Aunque este proceso ha sido ampliamente caracterizado en mamíferos, en los que ocurre principalmente en la médula ósea, en peces se desarrolla en el pronefros o riñón cefálico. Este órgano cumple un rol dual, actuando tanto como sitio de producción como de almacenamiento de células sanguíneas. A pesar de estas diferencias anatómicas, los mecanismos y tipos celulares involucrados en la hematopoyesis presentan similitudes funcionales con los de otros vertebrados (Hoggatt & Pelus, 2013; Kondera, 2019), lo que ha permitido utilizar modelos comparativos para su estudio.

La hematopoyesis se organiza en una jerarquía de diferenciación que va desde las células madre hematopoyéticas hasta las células sanguíneas maduras. Estas células troncales pueden autorrenovarse y diferenciarse en diversos tipos de células; les siguen las células progenitoras, que aún conservan cierta capacidad de diferenciación y pueden formar colonias eritroide, mieloide, linfoide o megacariocítica; luego, las células precursoras, más especializadas, como eritroblastos, mieloblastos o megacariocitos; y finalmente, las células maduras que circulan en sangre y cumplen funciones específicas (Mera Reina et al., 2007). Este ordenamiento refleja una regulación fina que responde a una interacción compleja entre señales endógenas, como hormonas y citocinas, y factores externos o ambientales que pueden activar o modular respuestas fisiológicas, incluyendo la expresión génica (Oltova et al., 2018).

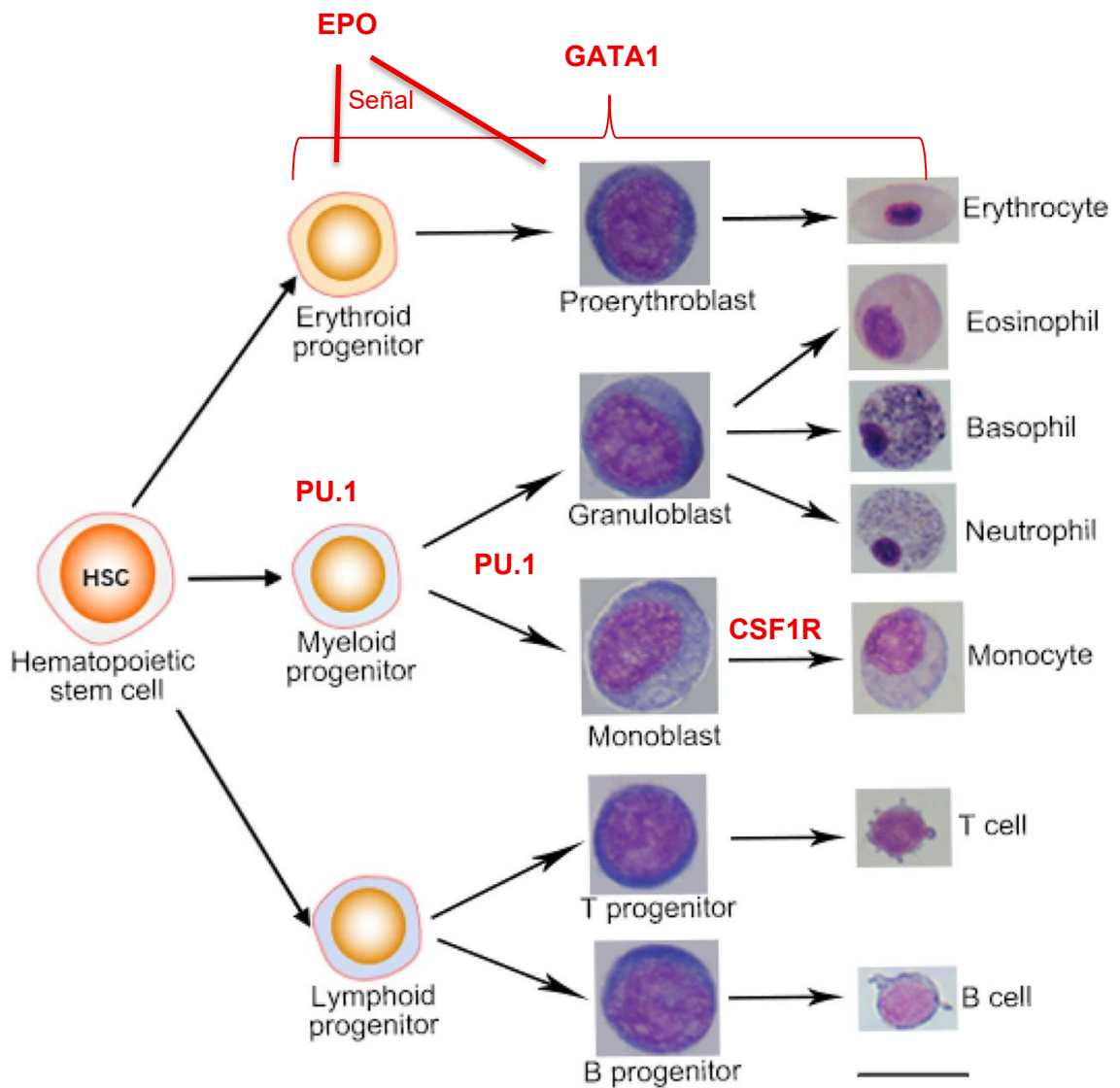


Figura 4. Proceso de diferenciación en la hematopoyesis definitiva de *Larimichthys crocea* (Modificado de Zhong et al., 2025)

La relevancia de estudiar las células sanguíneas y su proceso de formación radica en sus múltiples funciones. Dentro de los linajes derivados de la hematopoyesis, el linaje eritroide está directamente involucrado en el transporte de gases y en el mantenimiento de la homeostasis, mientras que el linaje mieloide da origen a células efectoras de la inmunidad innata, fundamentales para la defensa frente a agentes patógenos. Por lo tanto, alteraciones en el proceso de diferenciación hacia estos linajes pueden reflejar desequilibrios fisiológicos y comprometer la capacidad de adaptación del organismo frente a distintos desafíos ambientales (Esteban et al., 2006). En este contexto, cobra

especial importancia evaluar cómo el fotoperíodo en su condición de factor ambiental podría impactar la hematopoyesis de *Salmo salar*.

Para evaluar la hematopoyesis a nivel molecular, es fundamental analizar la expresión de genes que participan en las distintas etapas del proceso, regulando tanto la diferenciación celular como las funciones inmunitarias asociadas.

Uno de los factores clave es **GATA1 (GATA Binding Protein 1)**, un factor de transcripción esencial en la formación de eritrocitos, encargado de activar la expresión de genes específicos del linaje eritroide. Además, GATA1 suprime la especificación hacia células mieloides, regulando así el destino de las células progenitoras hematopoyéticas. (Aihua & Yan, 2024)

Por otro lado, la hormona **EPO (Eritropoyetina)** estimula directamente la expansión y diferenciación de las células eritroides, activando genes específicos de este linaje en respuesta a condiciones de hipoxia. Este estímulo promueve la proliferación de precursores eritroides, elevando los niveles de EPO en plasma, especialmente desde órganos como el riñón y el hígado. (Aihua & Yan, 2024)

En cuanto al componente mieloides e inmune, **CSF1R (Colony Stimulating Factor 1 Receptor)** un receptor de tirosina cinasa presente en células hematopoyéticas, media la acción del factor CSF1, favoreciendo la proliferación, diferenciación y supervivencia de macrófagos. Este gen está implicado además en procesos de inflamación, reparación tisular y modulación de la respuesta inmune. (Smith et al., 2021)

Finalmente, el factor de transcripción **PU.1** regula la diferenciación de células mieloides y linfoides, siendo esencial para el desarrollo de macrófagos y linfocitos B. En el contexto de la hematopoyesis eritroide, PU.1 actúa como represor, interfiriendo con la acción de GATA1. Por ello, la regulación coordinada entre ambos factores es clave para determinar el destino celular de los progenitores hematopoyéticos (Hsu et al., 2004).

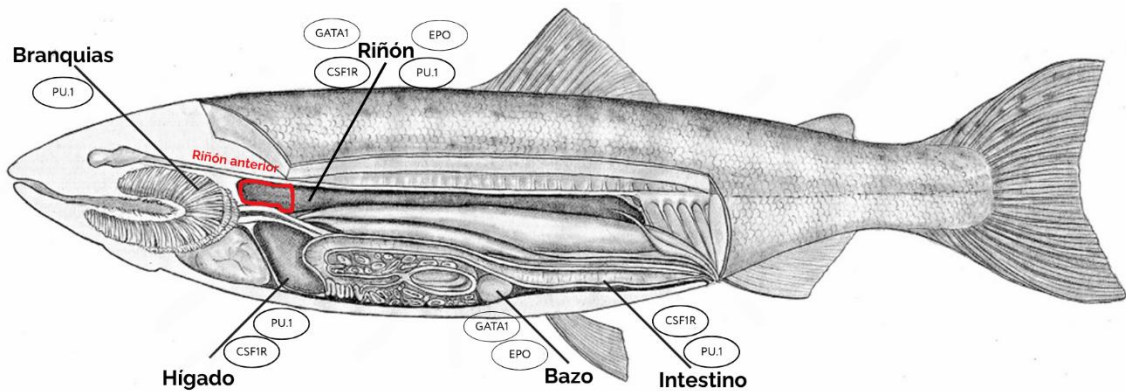


Figura 5. Esquema sobre ilustración de *Salmo salar* indicando órganos y tejidos principales de expresión de los genes de interés.

A pesar de que el uso de fotoperíodo artificial se ha consolidado como una herramienta clave en el manejo productivo de la salmonicultura, existe aún un vacío de conocimiento respecto a sus efectos a nivel hematopoyético e inmunológico, especialmente en lo que concierne a la regulación génica de la hematopoyesis en estadios juveniles de salmónidos en cultivo. Esta es una línea crítica de estudio, dado que la hematopoyesis es un proceso central para la mantención de la homeostasis y la inmunocompetencia, y podría verse afectada negativamente por exposiciones lumínicas artificiales que alteran ritmos circadianos y ejes hormonales, como es el caso de la melatonina. En este contexto, resulta fundamental evaluar cómo la manipulación del fotoperíodo influiría en la expresión de genes relacionados con rutas específicas de diferenciación hematopoyética en juveniles de *Salmo salar*, así como determinar las posibles implicancias de estos cambios sobre la homeostasis, la respuesta inmune y su impacto en el rendimiento productivo, considerando también sus posibles efectos ecofisiológicos y biológicos a mayor escala.

2. HIPÓTESIS

H1: La aplicación de fotoperíodos artificiales prolongados en juveniles de *Salmo salar* modula diferencialmente la expresión relativa de genes claves del linaje eritropoyético (GATA1 y EPO), reflejando cambios la homeostasis hematológica.

H0₁: La aplicación de fotoperíodos artificiales prolongados en juveniles de *Salmo salar* no produce cambios significativos en la expresión relativa de genes asociados al linaje eritropoyético (GATA1 y EPO), no alterando la homeostasis hematológica.

H2: La aplicación de fotoperíodos artificiales prolongados en juveniles de *Salmo salar* modula diferencialmente la expresión relativa de genes asociados al linaje mielóide (PU.1 y CSF1R) reflejando alteraciones en la inmunocompetencia del pez.

H0₂: La aplicación de fotoperíodos artificiales prolongados en juveniles de *Salmo salar* no produce cambios significativos en la expresión relativa de genes asociados al linaje mielóide (PU.1 y CSF1R), no existiendo alteraciones en la inmunocompetencia del pez.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general:

Evaluar el impacto de diferentes regímenes de fotoperíodo artificial sobre la hematopoyesis en juveniles de *S. salar* mediante el análisis de la expresión relativa de genes (GATA1, EPO, CSF1R y PU.1) asociados al proceso de la hematopoyesis para determinar el impacto sobre la hemostasis e inmunocompetencia

3.2 Objetivos específicos:

- I. Evaluar la expresión relativa de los genes GATA1, EPO, CSF1R y PU.1 en individuos juveniles de *Salmo salar* expuestos a distintos regímenes de fotoperíodo por RT-qPCR desde muestras de tejido de riñón anterior.
- II. Comparar la expresión génica entre tratamientos y el cambio de régimen lumínico entre peces sometidos a fotoperíodos contrastantes (LD 24:0, LD12:12 y LD14:10) durante el período experimental determinando diferencias entre los fotoperíodos
- III. Analizar los cambios de expresión génica en el contexto de la hematopoyesis evaluando el equilibrio entre linajes eritropoyéticos y mieloides como indicador del estado fisiológico e inmunológico de los peces.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Peces

Un total de **120** ejemplares juveniles de salmón atlántico (*Salmo salar*), procedentes de la empresa Salmones Australis S.A., con un peso promedio inicial de 60g, mantenidos desde agosto 2024 en la Unidad Experimental 2 del Laboratorio de Piscicultura y Patología Acuática fueron trasladados a la Unidad Experimental 1 del laboratorio para distribuirse en **6 estanques** de fibra de vidrio de 180 litros (**n=20** peces/estanque). La primera etapa correspondió a la aclimatación de los peces durante 20 días, en el cual se alimentó a razón del 2% del peso corporal con pellet comercial, con variabilidad conforme a la apetencia presentada. Los parámetros de calidad del agua se monitorearon diariamente manteniéndose la temperatura a 13-15° C, oxígeno disuelto en un rango de 8 a 9 mg/L, pH 6.5-7.0 y salinidad 3-4ppt. El fotoperíodo durante la etapa de aclimatación (Figura 6) fue de luz natural tenue proveniente de las ventanas en la unidad experimental en las primeras y últimas horas del día y la aplicación de luz blanca durante las 8 horas de mayor iluminación (9:00 a 17:00 horas).



Figura 6. Distribución de horas de luz durante el período de aclimatación.

4.2 Diseño experimental

Se trabajó con tres grupos experimentales de *Salmo salar*, cada uno expuesto a una configuración distinta de fotoperíodo artificial. El grupo 1 fue mantenido bajo un fotoperíodo LD 24:0, simulando condiciones de luz artificial constante, como las utilizadas intensivamente en sistemas acuícolas. El grupo 2 se expuso a un fotoperíodo LD 12:12, que corresponde al fotoperíodo del equinoccio de primavera, mientras que el grupo 3 se mantuvo bajo un régimen LD 14:10, simulando condiciones de luz típicas del verano. Cada tratamiento fue replicado en un estanque independiente.

Iniciada la aplicación de fotoperíodo artificial, los peces se mantuvieron bajo estas condiciones durante 45 días. Posteriormente, en una segunda etapa, todos los grupos fueron trasladados a un fotoperíodo control común (LD 12:12) durante 15 días adicionales.

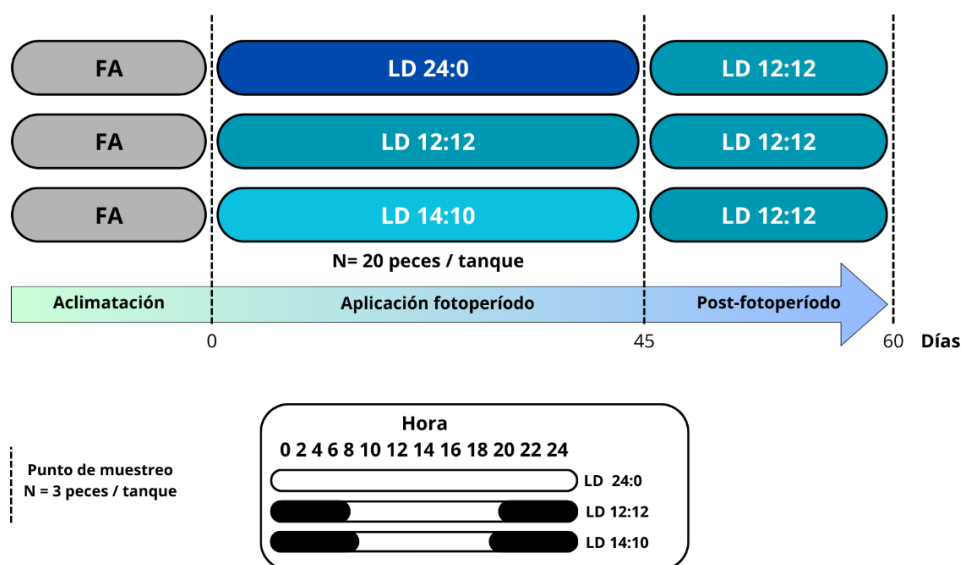


Figura 7. Representación esquemática del diseño experimental. LD = Light Dark. FA = Fotoperíodo de aclimatación definido en figura 6.

Los parámetros fisicoquímicos del agua fueron mantenidos constantes en todos los estanques: temperatura entre 12 y 15 °C, oxígeno disuelto entre 8 y 9 mg/L, y pH entre 6.5 y 7.0. La alimentación se ajustó al 1% del peso corporal total, considerando la apetencia observada en los peces durante la aclimatación y el inicio el ensayo.

4.2.1 Instalación de luces

Para la aplicación de luces de fotoperíodo artificial los estanques fueron cubiertos externamente con dos capas de polietileno negro de grosor 0,10mm., con el fin de evitar la entrada de luz externa. Se emplearon lámparas led de luz blanca (Ekoline, 5W, 240V) situadas a 20 cm sobre la superficie, controladas con temporizadores programables que regulan la cantidad de horas luz en cada estanque para los fotoperíodos LD 24:0 y LD 14:10, mientras que para el grupo expuesto a LD 12:12 se utilizó una luz led aérea (Philips, E27, 30W, 100-240V) a ras del techo de la unidad experimental (Figura 8). Se evaluó la longitud de onda e intensidad de la luz hacia los estanques con el Espectrómetro OHSP350 (Hangzhou HOPOO Optical Color technology Co., Ltd) dando en ambos casos λ 575 nm e intensidad variable (Figura 9).



Figura 8. Disposición de estanques para la aplicación de fotoperíodo artificial. **A:** Estanques aislados para fotoperíodo LD 24:0. **B:** Estanques aislados para fotoperíodo LD 14:10. **C:** Luz aérea y estanques de fotoperíodo LD 12:12. (Imagen recreada por medio de Gemini)

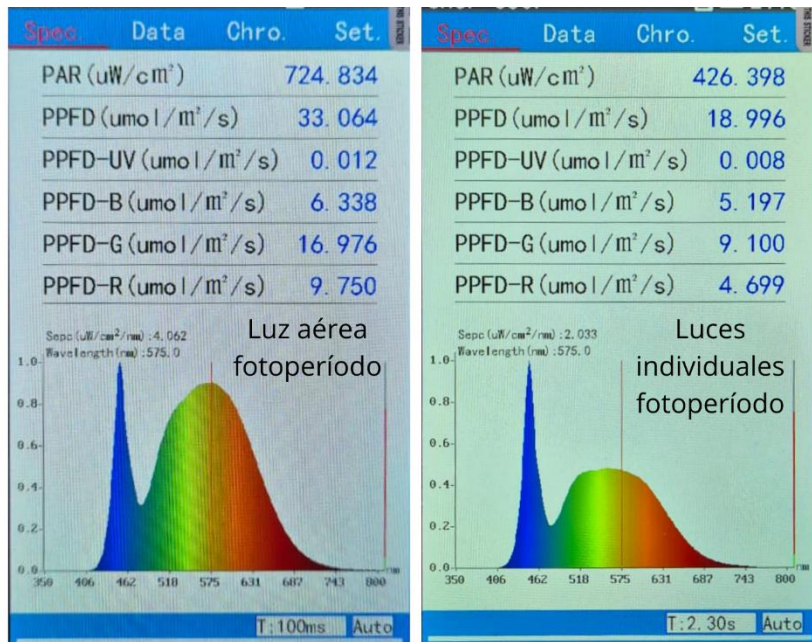


Figura 9. Parámetros y espectro de luz entregados por el espectrómetro para la luz a ras de techo de la unidad experimental, y dentro de cada estanque aislado para fotoperíodo.

4.2.2 Muestreos

Previo al inicio del ensayo se tomaron las muestras tiempo 0 (T0) para establecer la condición basal de los peces en cada uno de los estanques. El muestreo tiempo 1 (T1) se realizó a los 45 días de fotoperíodo. El último muestreo, tiempo 2 (T2) se realizó 15 días después del T1, habiendo dejado los peces con fotoperíodos LD 24:0 y LD 14:10 con fotoperíodo LD 12:12 en ese tiempo. Cada muestreo constó de un $n = 3$ por cada estanque, es decir $n = 6$ por cada grupo de fotoperíodo.

Para dicho propósito, los peces fueron sacrificados con sobredosis de anestesia aplicando p-amino-benzoato de etilo (Benzocaína 20%, BZ-20®, Veterquímica) en una inmersión en 10 mL de benzocaína en 5 litros de agua. Posteriormente, se registró el peso (g) y longitud horquilla (cm) de los individuos muestreados y se tomó a cada uno una muestra de sangre periférica de la vena caudal (Figura 10) utilizando heparina como anticoagulante. Se realizó la extracción de la porción anterior de riñón y estas muestras que fueron almacenadas en tubos eppendorf de 1,5 mL con 1,25 mL de solución estabilizadora de RNA (RNA later) a -4°C por 24 horas y posterior a eso a -20°C para su análisis de expresión génica mediante RT-qPCR.

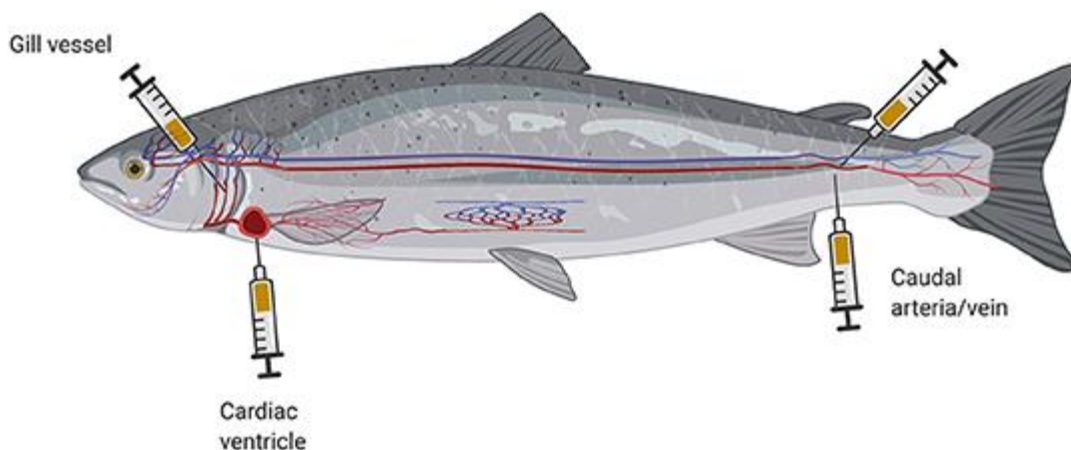


Figura 10. Ilustración esquemática de diferentes ubicaciones para toma de muestras de sangre de *Salmo salar* (Seibel et al., 2021).

4.3 Índices de crecimiento

Complementario a la información obtenida de los muestreos biológicos de riñón, se realizó en el día 1 (n=20), día 17 (n=20), día 45 (n=17) y día 60 (n=14) muestreos biométricos (peso y longitud horquilla) con el total de peces de cada grupo para realizar los cálculos correspondientes a la ganancia total de peso, Factor de Conversión de Alimento, Tasa Específica de Crecimiento y factor de condición. A nivel estadístico los datos fueron tabulados y graficados por medio de Excel, y analizados por GraphPad Prism mediante ANOVA de dos vías seguida de la prueba post-hoc de Tukey para evaluar interacción entre fotoperíodos y tiempos.

4.3.1 Porcentaje de ganancia de peso

El porcentaje de ganancia de peso de los peces sometidos a los diferentes regímenes de fotoperiodo artificial se determinó considerando el inicio y final del ensayo (día 0 y 45) y mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Ganancia} = (\text{Peso final} - \text{Peso inicial}) * 100 / \text{Peso inicial}$$

4.3.2 Factor de Conversión de Alimento FCR

El FCR, o Factor de Conversión de Alimento, se utiliza para medir la eficiencia de la conversión de alimento en biomasa de los peces, y se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{FCR} = \text{Alimento consumido (kg)} / \text{Biomasa final (kg)} - \text{Biomasa inicial (kg)}$$

4.3.3 Tasa Específica de Crecimiento SGR

La tasa específica de crecimiento (SGR), utilizada para medir la tasa de crecimiento diario de los peces, se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{SGR} = [(\ln(\text{Peso Final (g)}) - \ln(\text{Peso Inicial(g)})) / \text{Tiempo (días)}] * 100$$

4.3.4 Factor de condición

El factor de condición corporal de Fulton (K), utilizado para comparar condición de los peces se calculó por medio de la siguiente fórmula:

$$K = 100 * (W/L^3)$$

Donde W corresponde al peso (g) y L a la longitud (cm).

4.4 Procesamiento de muestras para análisis molecular

4.4.1 Extracción y purificación de ARN

A partir de las muestras de tejido de riñón anterior se llevó a cabo el procedimiento de aislamiento y purificación de ARN mediante TRIzol. La extracción de ARN se realizó a cada muestra individualmente siguiendo el protocolo correspondiente (ANEXO 1). Las muestras de ARN extraído fueron almacenadas a -80°C a partir de este punto.

4.4.2 Cuantificación e integridad del ARN

Para la cuantificación del ARN se utilizó un equipo lector de placas Sinergy® HTK Take3 Microvolume (BioTek, Agilent Technologies, USA) que mediante una muestra mínima de 2µL indica el valor de concentración de ARN obtenido de la extracción, y esto se repitió con todas las muestras (ANEXO 2). Por otro lado, la integridad del ARN fue determinada mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% (Ejemplo en ANEXO 3).

4.4.3 Síntesis de cDNA y prueba de partidores

Para prevenir la posible contaminación con ADN genómico, cada muestra fue tratada con DNAsa utilizando el protocolo y reactivos de New England Biolabs (ANEXO 4) y trabajando dentro de cabina de flujo laminar.

Posteriormente, a partir del ARN total purificado, se realizó la síntesis de ADN complementario (cDNA) mediante retrotranscripción, utilizando el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante (ANEXO 5). Para cada reacción se incluyó un control negativo sin la enzima retrotranscriptasa, con el fin de verificar la ausencia de ADN genómico residual. Este cDNA fue almacenado a -20°C mientras no era trabajado.

A continuación, se realizó una PCR convencional para las muestras y sus respectivos controles para evaluar la especificidad de cada partidador (Tabla 1) utilizando GoTaq® Green Master Mix, conforme al protocolo del fabricante (ANEXO 6). Los productos amplificados se visualizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% preparado con tampón TAE 1X, donde se deben observar amplicones únicamente en las muestras con retrotranscriptasa para descartar contaminación. Para cada par de partidores se evaluó un rango de temperaturas de alineamiento, permitiendo definir la temperatura ideal. La correcta amplificación de todos los partidores permitió avanzar al rango dinámico por medio de las reacciones de RT-qPCR.

Nombre del gen	Secuencia 5' → 3' Forward	Secuencia 5' → 3' Reverse
GATA1	CCTCTACTCTCCAGGGGCAT	GTCCCATCTCGACGCCATAG
EPO	CCTGCGGGTCCTAAAACACT	TTTGGGGAACAGTGACGGG
CSF1R	CAGAGCGTCCTGACAATGGA	GGCGAAGGTGTCTTTACCGA
PU.1	GTCTGAGAGACCACATTGC	TCTTGTTGCCCAATTCTCC

Tabla 1. Secuencias de partidores utilizados.

4.5 RT-qPCR

Las reacciones de RT-qPCR se llevaron a cabo en un equipo AriaMx Real-time PCR System, utilizando el kit Brilliant II SYBR® Green qPCR Master Mix (Agilent Technologies) (Protocolo en ANEXO 7) en placas de 96 pocillos. El gen de referencia Factor de Elongación alfa (EF-1 α) se utilizó como normalizador para todos los ensayos RT-qPCR.

4.5.1 Rango dinámico

Para validar y estandarizar los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de RT-qPCR, se realizó una curva de rango dinámico, la cual consiste en ejecutar reacciones a partir de un intervalo de concentraciones de cDNA provenientes de una muestra estándar. El objetivo es comprobar que la amplificación es lineal y cuantificable, es decir, que los cambios en la cantidad de ARN o cDNA inicial se reflejan proporcionalmente en los resultados. A partir del cDNA de una muestra control para estandarización, con una concentración de 100 ng/ μ L, se realizaron 6 diluciones seriadas con factor de dilución de 5 para sembrar en 6 pocillos, y así obtener la curva de rango dinámico (ANEXO 8).

El equipo AriaMx calcula automáticamente la eficiencia de amplificación a partir de la pendiente de la curva estándar, generada al graficar los valores de Ct en función del logaritmo de la concentración de cDNA. La eficiencia se obtiene mediante la fórmula:

$$\text{Eficiencia} = -1 + 10^{(-1/\text{pendiente})}$$

De tal modo, se obtuvo la eficiencia de cada pareja de partidores (Tabla 2). Se consideran valores aceptables de eficiencia entre 90 % y 110 % para asegurar una amplificación precisa y lineal.

Primer	Eficiencia (%)
GATA1	98,6
EPO	100,2
CSF1R	102,04
PU.1	92,4
EF-1 α	99

Tabla 2. Valores de eficiencia de cada par de partidores obtenidos mediante rango dinámico.

El equipo AriaMx Real-time PCR System cuenta con programas de PCR cuantitativo por defecto, el más típico fue utilizado para todas las reacciones de las muestras (Figura 11) ajustando la temperatura en los ciclos de amplificación a 58°C. Y un programa definido por el usuario fue utilizado para las reacciones de placas para rango dinámico (Figura 12).

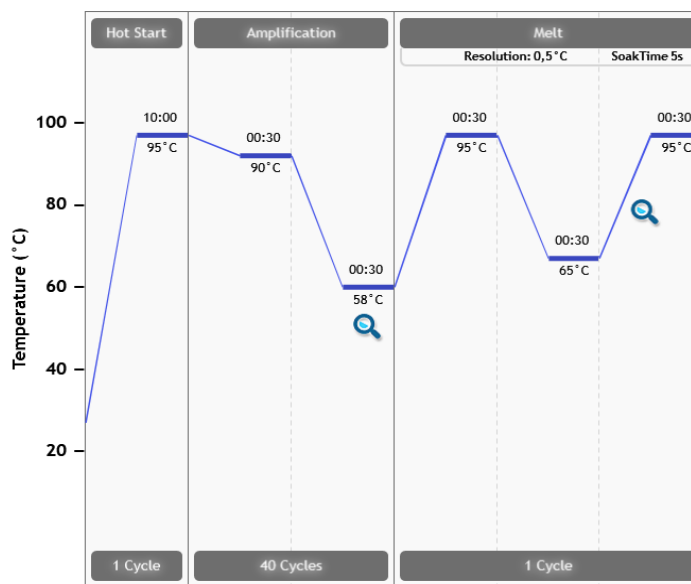


Figura 11. Perfil térmico utilizado en las reacciones de RT-qPCR para las muestras de los grupos de fotoperíodo.

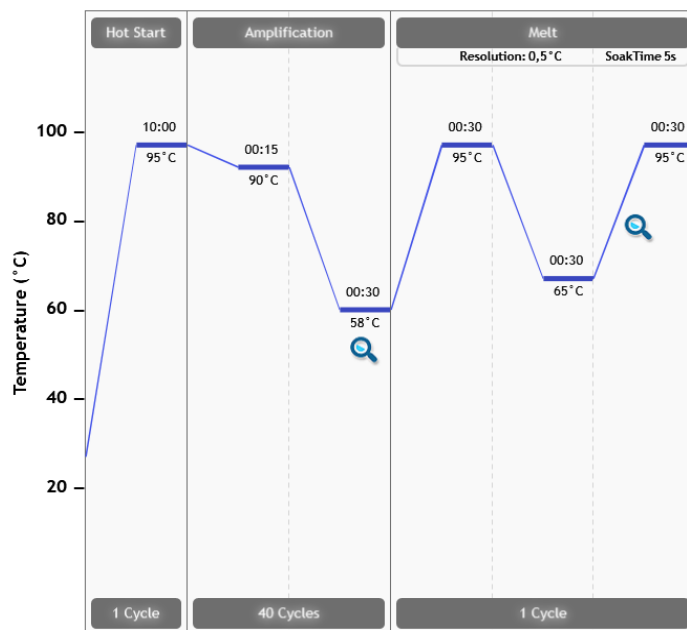


Figura 12. Perfil termal utilizado para las reacciones correspondientes a la elaboración de rango dinámico de partidores.

4.6 Análisis estadístico expresión génica

Una vez obtenidos los resultados de la expresión génica a partir del software AriaMx (Agilent), se exportaron los valores de **Ct** y **Tm** a planillas Excel para su posterior análisis. Con los resultados de eficiencia de primers obtenidos del rango dinámico, se hizo los cálculos de expresión relativa con el **método de Pfaffl**, el cual incorpora dichas eficiencias en los cálculos por medio de la siguiente fórmula:

$$Gene\ expression\ ratio = \frac{(E_{GOI})^{\Delta Ct\ GOI}}{(E_{HKG})^{\Delta Ct\ HKG}}$$

Donde:

E_{GOI} es eficiencia del primer del gen de interés.

E_{HKG} es eficiencia del primer del gen normalizador

ΔCt es diferencia de Ct entre el grupo control y el grupo experimental

Los resultados de las muestras del Tiempo 0 funcionaron como calibrador, cuyos valores fueron estandarizados a 1, permitiendo así calcular la expresión relativa de los grupos experimentales en relación con ese punto de referencia. De esta manera, los cambios en la expresión de los genes de interés en los otros tiempos se observarán como fold change respecto a T0.

Los resultados obtenidos fueron graficados y analizados mediante el software **GraphPad Prism 10**. Para evaluar los efectos del tratamiento (fotoperíodo) y del tiempo de exposición sobre la expresión génica, se aplicó un ANOVA de dos vías para cada gen evaluado. Las diferencias entre grupos y tiempos se consideran significativas cuando el valor de p es menor a 0.05.

4.7 Declaración de bienestar animal

Todas las actividades experimentales descritas en este estudio fueron realizadas bajo estrictas condiciones de bienestar animal, en conformidad con la legislación chilena vigente (Ley N° 20.380 sobre Protección de los Animales) y las normativas internas de la Universidad de Concepción para el uso ético de animales en investigación científica.

Los peces fueron mantenidos en condiciones ambientales controladas, con monitoreo permanente de parámetros fisicoquímicos del agua (temperatura, oxígeno disuelto, pH y salinidad), y alimentados con dieta comercial de acuerdo con sus requerimientos nutricionales y niveles de apetencia. Las condiciones de luz fueron reguladas cuidadosamente según el diseño experimental, utilizando iluminación artificial programada sin inducir estrés lumínico abrupto.

Los procedimientos de muestreo, manipulación y sacrificio se llevaron a cabo minimizando el dolor, el sufrimiento y el estrés de los peces. Para la eutanasia, se utilizó una sobredosis de benzocaína (BZ-20®, Veterquímica), siguiendo protocolos validados para teleósteos. Todas las extracciones de tejido fueron realizadas inmediatamente posterior a la eutanasia, garantizando un manejo rápido, respetuoso y ético de los animales.

Este proyecto fue autorizado y supervisado por el laboratorio de Piscicultura y Patología Acuática de la Universidad de Concepción, bajo un enfoque de reemplazo, reducción y refinamiento (principios de las 3R), asegurando la pertinencia científica del estudio y el respeto por los animales utilizados, así como manteniendo los peces cubriendo los 5 dominios asociados al bienestar de animales en cautiverio en función de los protocolos internos del laboratorio para tal efecto.

5. RESULTADOS

5.1 Efecto de los distintos fotoperíodos en el crecimiento

5.1.1 Ganancia de peso

Durante los primeros 45 días de exposición a los distintos regímenes de fotoperíodo, se observaron diferencias en la ganancia de peso corporal y en la tasa específica de crecimiento (SGR) de los juveniles de *Salmo salar* (Figura 13). El mayor porcentaje de ganancia de peso se registró en los peces sometidos a luz continua LD 24:0, con un aumento del 61,4%, seguido por los individuos del grupo LD 12:12, que mostraron un incremento del 55,6%. En contraste, el grupo con menor ganancia fue el expuesto al régimen LD 14:10, con un aumento del 41,9%. (Tabla 3). En cuanto a la tasa específica de crecimiento, esta fue coherente con los resultados anteriores. Sin embargo, la prueba única diferencia significativa entre los datos de peso por grupos de T1 se observó entre el fotoperíodo LD 24:0 y LD 14:10 ($p = 0,0008$).

Fotoperíodo	Peso \bar{x} inicial	Peso \bar{x} final	Ganancia de peso (%)	Tasa específica de crecimiento (%/día)
LD 24:0	74,6	120,38	61,4	1,06
LD 12:12	72,7	113,18	55,6	0,98
LD 14:10	74,8	106,07	41,9	0,78

Tabla 3. Ganancia de peso (%) y tasa específica de crecimiento (SGR) para los tres fotoperíodos del T0 (día 1) al T1 (día 45). Las diferencias estadísticas entre los datos de peso se analizaron mediante ANOVA de dos vías y la prueba post hoc de Tukey para la comparación entre fotoperíodos.

Durante los 15 días posteriores al cambio al fotoperíodo LD 12:12 común para todos los grupos, los peces que habían sido expuestos previamente a distintos regímenes lumínicos presentaron diferencias en el incremento de peso corporal. El grupo de anteriormente fotoperíodo continuo LD 24:0 mostró el mayor porcentaje de ganancia de peso, con un 32,5% de aumento, seguido por el grupo LD 12:12 con una ganancia del 29,7%. La diferencia de peso entre estos grupos resultó estadísticamente significativa ($p = 0,0069$).

El menor incremento se observó en el grupo expuesto al fotoperiodo LD 14:10, que registró un 19,3% de aumento, la diferencia fue estadísticamente significativa tanto con el grupo LD 24:0 ($p = <0,0001$) como el grupo LD 12:12 ($p = <0,0001$). En términos de tasa específica de crecimiento, el grupo LD 24:0 también presentó el valor más alto, seguido por el grupo LD 12:12 y finalmente el grupo LD 14:10. (Tabla 4)

Fotoperíodo	Peso \bar{x} inicial	Peso \bar{x} final	Ganancia de peso (%)	Tasa específica de crecimiento (%/día)
LD 24:0	120,38	159,5	32,5	1,88
LD 12:12	113,18	146,8	29,7	1,73
LD 14:10	106,07	126,5	19,3	1,18

Tabla 4. Ganancia de peso (%) y tasa específica de crecimiento (SGR) para los tres fotoperíodos desde el T1 (día 45) al T2 (día 60). Las diferencias estadísticas se analizaron mediante ANOVA de dos vías y la prueba post hoc de Tukey para la comparación entre fotoperíodos.

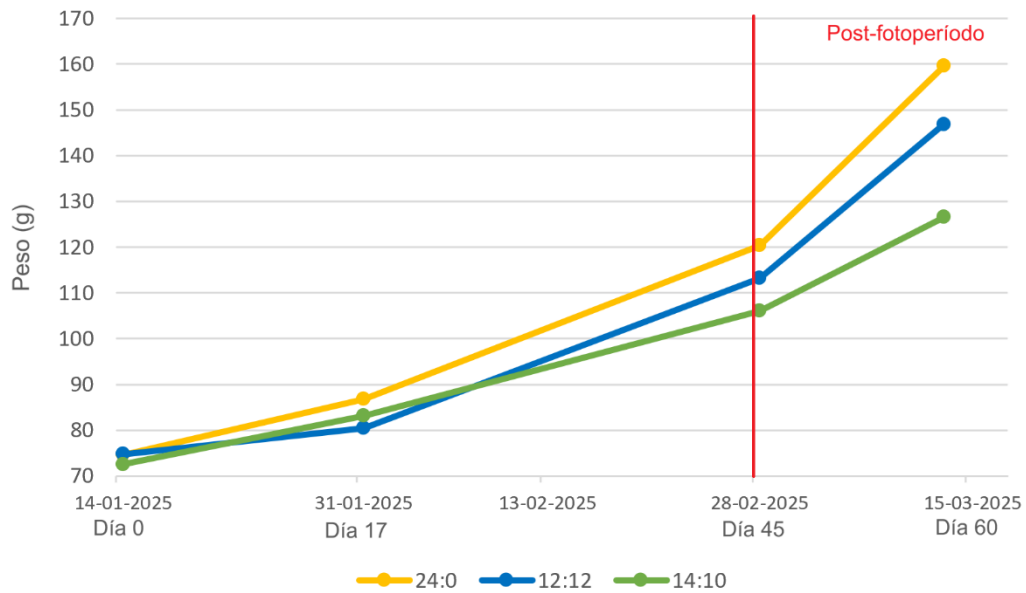


Figura 13. Aumento de peso de los grupos de fotoperíodo con los datos biométricos del n total de peces obtenidos al día 1, 17, 45 y 60.

5.1.2 Factor de conversión de alimento (FCR)

La conversión del alimento en ganancia de peso fue más eficiente en el grupo expuesto a fotoperiodo de luz continua LD 24:0, el cual presentó un FCR de 1,39. De manera consecutiva, el grupo bajo fotoperiodo LD 12:12 obtuvo un FCR de 1,47, y, por último, el grupo sometido a fotoperiodo LD 14:10 manifestó un FCR de 1,86; siendo este grupo el menos eficiente en conversión de alimento.

Fotoperíodo	Biomasa inicial	Biomasa final	Alimento entregado	FCR
LD 24:0	2454,6	3967,2	2111	1,39
LD 12:12	3068	4638,9	2308,56	1,47
LD 14:10	2460	3614	2141,9	1,86

Tabla 5. Factor de conversión de alimento para los tres fotoperíodos del T0 (día 1) al T1 (día 45).

5.1.3 Factor de condición

Al finalizar el tiempo de exposición a los distintos fotoperíodos (T1), por medio de los valores de peso y longitud horquilla se realizó el cálculo de Factor de Condición de Fulton. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos pues el valor p al comparar cada grupo entre sí no fue menor de 0,5 (LD 24:0 vs. 12:12 $p = 0,4440$; LD 24:0 vs. 14:10 $p = 0,7922$; LD 12:12 vs. 14:10 $p = 0,1327$).

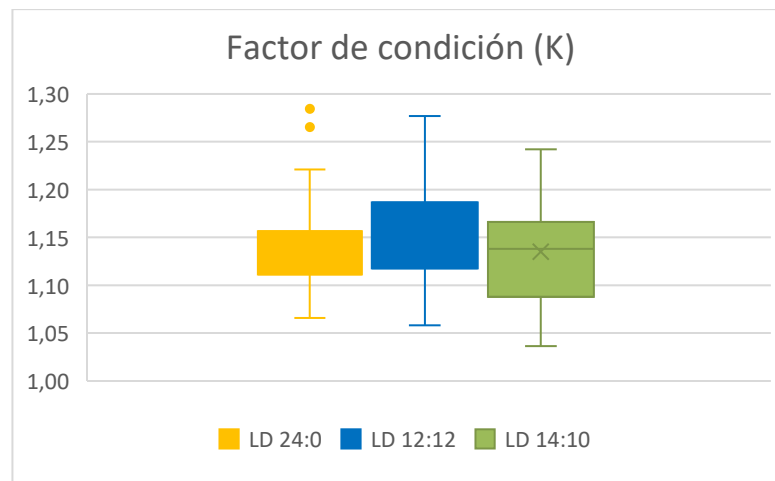


Figura 14. Factor de condición (K) de los tres grupos de estudio con datos recolectados el último día de fotoperíodo (T1, día 45).

5.2 Cuantificación de la expresión génica por RT-qPCR

5.2.1 Prueba de partidores

La reacción de PCR convencional realizada como paso previo para evaluar la especificidad de los partidores permitió observar amplicones únicamente en las muestras con retrotranscriptasa, mientras que no se detectaron bandas en los controles negativos (Figuras 15, 16). Esto confirmó tanto la especificidad de los partidores como la ausencia de contaminación con ADN genómico.

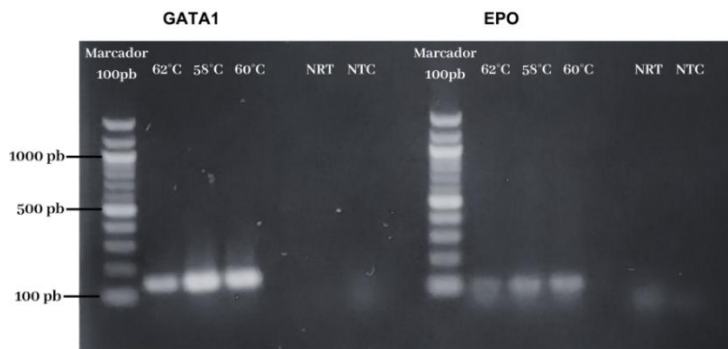


Figura 15. Electroforesis en gel preparado con TAE 1X y agarosa al 1,5% sembrado con el producto amplificado de PCR para muestras estándar con distintas temperaturas en el paso de alineamiento (62°C, 58°C y 60°C) con los partidores para GATA1 y EPO. NRT = Reacción sin enzima retro transcriptasa en el proceso de síntesis de ADNc. NTC = reacción sin primer.

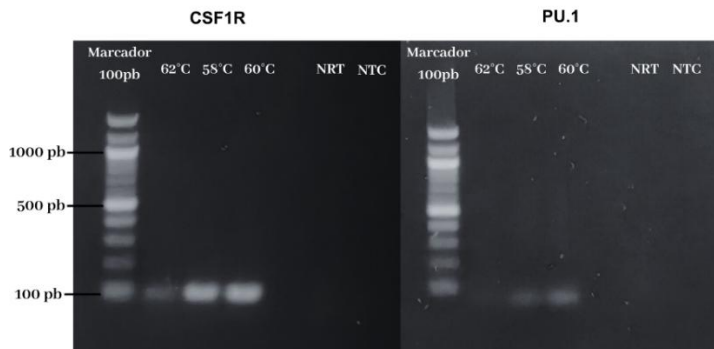


Figura 16. Electroforesis en gel preparado con TAE 1X y agarosa al 1,5% sembrado con el producto amplificado de PCR para muestras estándar con distintas temperaturas en el paso de alineamiento (62°C, 58°C y 60°C) con los partidores para CSF1R y PU.1. NRT = Reacción sin enzima retro transcriptasa en el proceso de síntesis de ADNc. NTC = reacción sin primer.

5.2.2 Eritropoyesis

A) **GATA1**: Luego de 45 días de exposición a fotoperíodo artificial, se observa gráficamente un aumento en la expresión de este factor de transcripción al compararla con el estado basal de los peces (Figura 17). En los tres fotoperíodos esta diferencia es estadísticamente significativa.

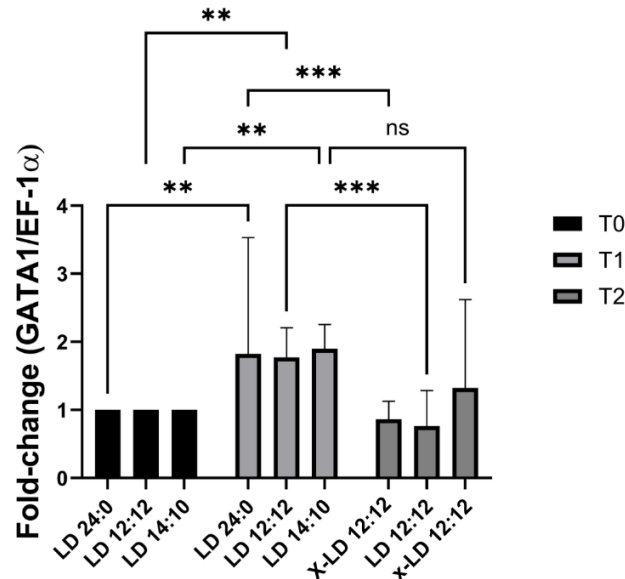


Figura 17. Expresión relativa del factor de transcripción GATA1 analizada mediante PCR en tiempo real en los tres grupos de fotoperíodo en el día 0, día 45 y día 60, correspondiendo el último punto al post 15 días de fotoperíodo LD 12:12 común. Los resultados de Tiempo 0 fueron utilizados como calibrador y se muestran estandarizados a 1. Los niveles de expresión se encuentran expresados como fold-change respecto a T0. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey para comparar por grupos de fotoperíodo entre los distintos tiempos. (ns > 0,05; * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001; **** = p < 0,0001). X = Ex fotoperíodo LD 24:0 x = Ex fotoperíodo LD 14:10.

Después de 15 días del cambio al fotoperíodo LD 12:12 para todos los grupos (T2) se observa una disminución en la expresión del gen al compararla con los resultados de expresión en T1. Esta disminución es menos evidente en el caso del fotoperíodo LD 14:10 y estadísticamente no es significativa. La diferencia entre la expresión de T0 y T2, en los tres fotoperíodos no es estadísticamente significativa, considerándose entonces este último punto a la par del estado basal de los peces.

B) Eritropoyetina: Pasados 45 días de exposición a fotoperíodo artificial, se evidencia un aumento en la expresión de esta hormona en todos los grupos en comparación con el estado basal de los peces, siendo más acentuada esta diferencia en el grupo expuesto a fotoperíodo LD 12:12, seguido del fotoperíodo LD 24:0 y finalmente el fotoperíodo LD 14:10 (Figura 18). Esta diferencia es altamente significativa estadísticamente.

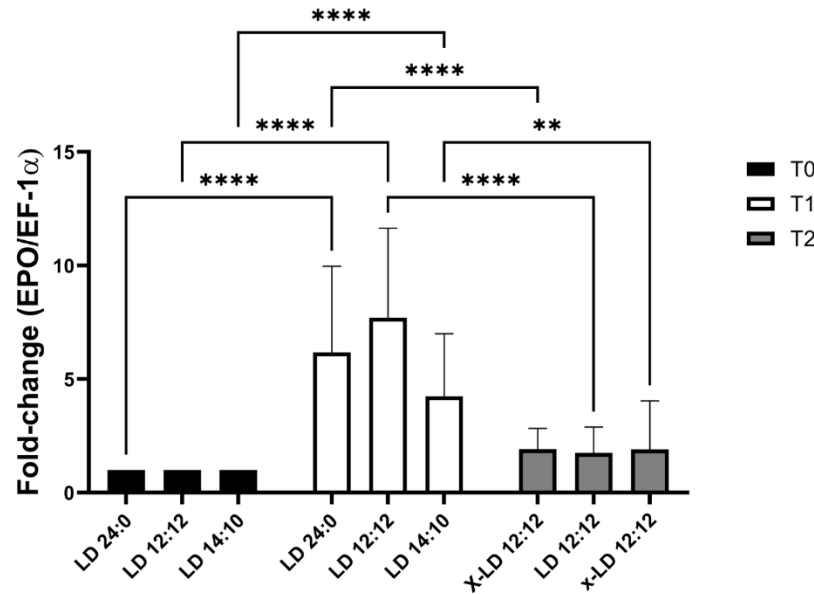


Figura 18. Expresión relativa de la hormona glicoproteica eritropoyetina (EPO) analizada mediante PCR en tiempo real en los tres grupos de fotoperíodo en el día 0, día 45 y día 60, correspondiendo el último punto al post 15 días de fotoperíodo LD 12:12 común. Los resultados de Tiempo 0 fueron utilizados como calibrador y se muestran estandarizados a 1. Los niveles de expresión se encuentran expresados como fold-change respecto a T0. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey para comparar por grupos de fotoperíodo entre los distintos tiempos. (ns > 0,05; * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001; **** = p < 0,0001). X = Ex fotoperíodo LD 24:0 x = Ex fotoperíodo LD 14:10.

Para T2, pasados 15 días en fotoperíodo LD 12:12, todos los grupos muestran de forma paralela una disminución en la expresión de este gen, la cual es estadísticamente significativa comparado con T1. La diferencia entre la expresión de EPO entre T0 y T2 es significativa, por lo que puede considerarse también que la eritropoyetina ha vuelto a su estado basal.

5.2.3 Mielopoyesis

C) **PU.1:** A los 45 días de exposición a fotoperíodo artificial, se manifiesta un evidente aumento en la expresión relativa del factor de transcripción PU.1 en el grupo expuesto a fotoperíodo de luz continua LD 24:0 con relación al estado basal de los peces en T0 (Figura 19). Este aumento se ve aún más acentuado en el grupo LD 14:10. En ambos casos, se trata de diferencias estadísticamente muy significativas.

Por otro lado, en el fotoperíodo LD 12:12 se aprecia una leve disminución de la expresión relativa en T1, comparada con T0, la cual no representa una diferencia significativa.

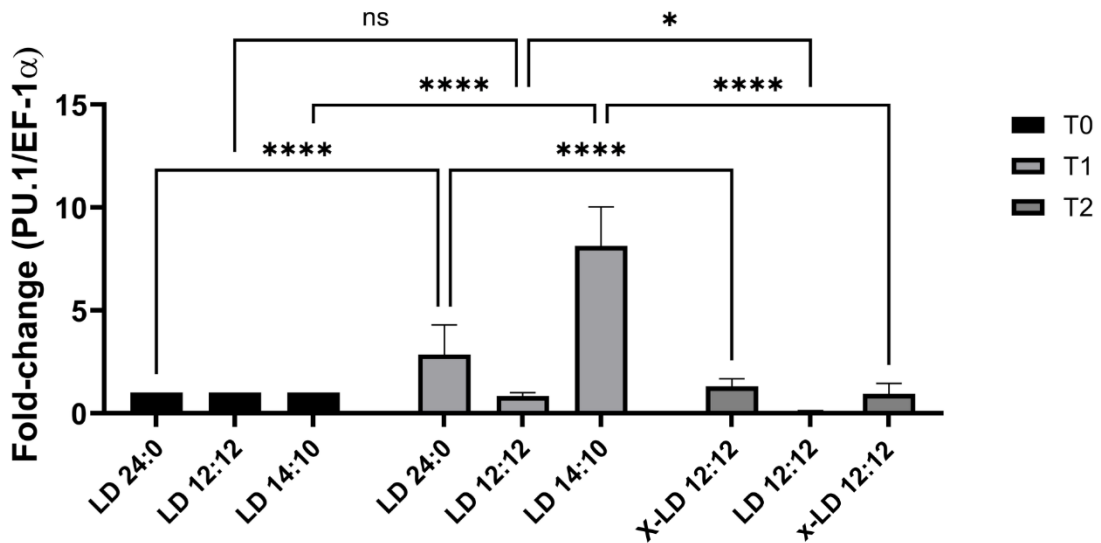


Figura 19. Expresión relativa del factor de transcripción PU.1 analizada mediante PCR en tiempo real en los tres grupos de fotoperíodo en el día 0, día 45 y día 60, correspondiendo el último punto al post 15 días de fotoperíodo LD 12:12 común. Los resultados de Tiempo 0 fueron utilizados como calibrador y se muestran estandarizados a 1. Los niveles de expresión se encuentran expresados como fold-change respecto a T0. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey para comparar por grupos de fotoperíodo entre los distintos tiempos. (ns > 0,05; * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001; **** = p < 0,0001). X = Ex fotoperíodo LD 24:0 x = Ex fotoperíodo LD 14:10.

D) CSF1R: A los 45 días de aplicación de fotoperíodo artificial en los grupos correspondientes al fotoperíodo LD 12:12 y LD 14:10 se observa una disminución en la expresión relativa del receptor del factor estimulante de colonias 1 a comparación del estado basal de los peces en T0, las cuales resultaron estadísticamente significativas. Mientras que el grupo LD 24:0 no manifestó una diferencia significativa en la expresión relativa comparada al T0.

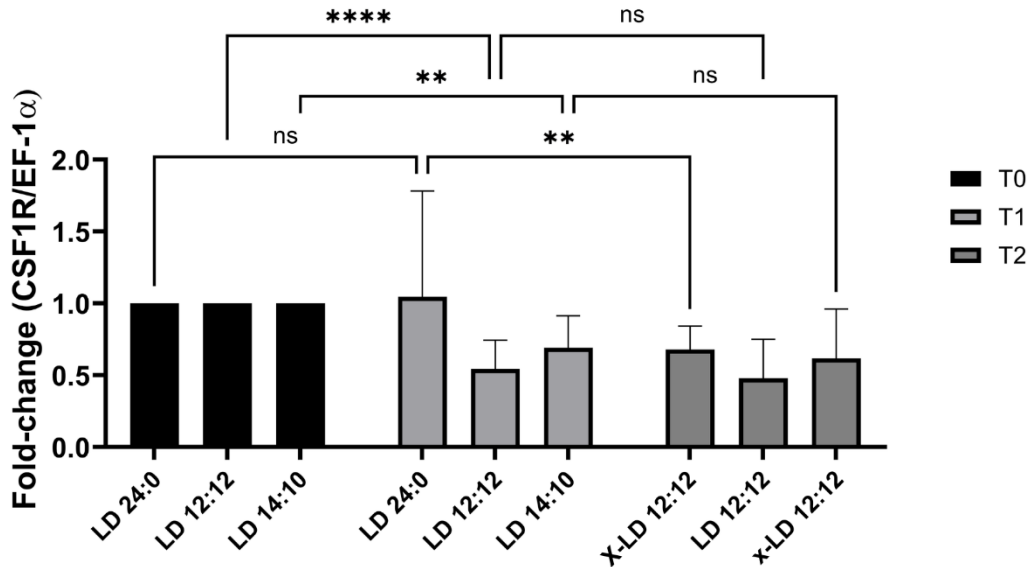


Figura 20. Expresión relativa del receptor del factor estimulante de colonias 1 analizada mediante PCR en tiempo real en los tres grupos de fotoperíodo en el día 0, día 45 y día 60, correspondiendo el último punto al post 15 días de fotoperíodo LD 12:12 común. Los resultados de Tiempo 0 fueron utilizados como calibrador y se muestran estandarizados a 1. Los niveles de expresión se encuentran expresados como fold-change respecto a T0. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey para comparar por grupos de fotoperíodo entre los distintos tiempos. (ns > 0,05; * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001; **** = p < 0,0001). X = Ex fotoperíodo LD 24:0 x = Ex fotoperíodo LD 14:10.

Respecto al T2, los valores de expresión pasados 15 días en fotoperíodo LD 12:12, mostraron una tendencia similar al T1 en los grupos correspondientes al fotoperíodo LD 12:12 y LD 14:10, por lo que cualquier diferencia no resultó significativa. En lo que respecta al grupo LD 24:0 presentó una disminución en la expresión relativa comparada al T1, la cuál es estadísticamente significativa.

6. DISCUSIÓN

Los resultados en lo que refiere a crecimiento y ganancia de peso indican que la luz continua LD 24:0 produjo la mayor ganancia de peso y la tasa específica de crecimiento más alta (61,4%), seguida por el grupo LD 12:12 (55,6%) y finalmente el grupo LD 14:10 (41,9%), sin embargo, estos datos no tienen significancia estadística. Pese a esto, si la tendencia observada se mantuviera en el tiempo, sería en gran parte coherente con lo esperable para *Salmo salar* y otras especies de salmónidos como *Oncorhynchus mykiss* (Turker & Yildirim, 2011).

Respecto a la luz continua, se ha afirmado que esta configuración aumenta la tasa de crecimiento y el peso corporal en *Salmo salar* cuando se mantiene en sistemas de recirculación de agua (RAS). Específicamente, se ha relacionado la exposición a luz continua en RAS con una mayor actividad alimentaria y eficiencia metabólica en peces, en comparación con los regímenes de luz-oscuridad balanceados, debido a la estimulación de procesos neuroendocrinos y circadianos que regulan el apetito, la motilidad intestinal y la secreción hormonal asociada al crecimiento (Biswas et al., 2005; Churova et al., 2020; Ytrestøyl et al., 2023).

El fotoperíodo LD 12:12 es a menudo utilizado como control ya que se considera semejante a un ciclo de luz/oscuridad más natural o invernal (Handeland & Stefansson, 2001). En comparación con la luz continua, que promueve un crecimiento más rápido, se esperaría que los peces en LD 12:12 tengan una tasa de crecimiento menor (Turker & Yildirim, 2011), y esto se condice con la tendencia observada en los resultados de este experimento, donde el grupo LD 12:12 tuvo una ganancia de peso ligeramente inferior a la del grupo LD 24:0. Si esto se acentúa estaría reafirmando que la luz continua ofrece ventajas de crecimiento por sobre los fotoperíodos cíclicos.

Aunque los fotoperíodos de día largo se asocian con crecimiento mejorado, estudios también indican que no todos los fotoperíodos extendidos son universalmente beneficiosos o que pueden tener efectos negativos dependiendo de la especie y las

condiciones específicas (Churova et al., 2020). En el caso de LD 14:10, que simula un fotoperíodo estival con predominancia de luz, mostró el menor rendimiento en crecimiento y menor eficiencia en la conversión de alimento, significativamente menor que el fotoperíodo LD 24:0. Si bien, no se encuentran muchos estudios que evalúen esta configuración de fotoperíodo, en *Salmo salar*, un fotoperíodo de LD 16:8 ha sido reportado como causante de menor crecimiento (Al-Emran et al., 2024). Esto sugiere que existe un rango óptimo de fotoperíodo que puede no ser "más largo es mejor". Sin embargo, es importante considerar que el período de evaluación del crecimiento fue relativamente corto (45 días en fotoperíodos diferentes y 60 días en total), lo cual podría limitar la proyección de estos efectos a largo plazo.

El trabajo de Al-Emran et al. (2024) menciona también que "el fotoperíodo manipulado ejerce una respuesta al estrés al alterar el perfil hematobioquímico de los peces". Es posible entonces que, para el grupo de *Salmo salar* bajo fotoperíodo de LD 14:10 se haya inducido una respuesta fisiológica subóptima para el crecimiento que no se observó en el grupo de luz continua o en el grupo de 12:12. Las dinámicas hormonales que regulan el crecimiento son complejas y se pueden ver afectadas por el fotoperíodo. Un fotoperíodo de día largo como el LD 14:10, distinto de la luz continua, podría no haber activado óptimamente los ejes hormonales de crecimiento o podría atribuirse a un desbalance entre el estímulo lumínico y la regulación endógena de los ritmos fisiológicos del pez, particularmente si el fotoperíodo no se acompaña de ajustes en temperatura, alimentación o densidad, que también son variables críticas en el rendimiento productivo.

Durante los 15 días posteriores, en que todos los grupos pasaron a fotoperíodo LD 12:12, los peces que habían estado en fotoperíodo de luz continua mantuvieron el mayor porcentaje de ganancia de peso (32.5%) y SGR, seguidos por el grupo que ya estaba en LD 12:12 (29.7%), y nuevamente el grupo que había estado en LD 14:10 tuvo el menor incremento (19.3%).

Esta persistencia en el rendimiento es coherente a lo que podría ser un efecto de arrastre, que afirma que las ventajas de crecimiento obtenidas en una fase temprana, especialmente

bajo luz continua, tienden a persistir (Ytrestøyl et al., 2023). Esto demuestra que una mejor tasa de crecimiento inicial como la observada en su grupo LD 24:0 puede dar una leve pero duradera ventaja en el tamaño y, por extensión, en la ganancia de peso absoluta, incluso cuando las condiciones posteriores se igualan. De manera inversa, el rendimiento inicial más bajo del grupo LD 14:10 parece haber tenido también un efecto de arrastre negativo, resultando en una menor ganancia de peso durante la fase de fotoperíodo común.

Complementando los indicadores de crecimiento, la eficiencia en la conversión de alimento (FCR) fue también superior en el grupo LD 24:0, seguido por LD 12:12 y finalmente LD 14:10, que presentó la menor eficiencia. Esto sugiere que la luz continua no solo favoreció el crecimiento, sino también una mejor utilización del alimento. La superioridad del régimen LD 24:0 en términos de FCR sugiere que los peces fueron capaces de convertir el alimento en biomasa de manera más eficiente bajo exposición constante a luz. Esta eficiencia podría estar asociada a un mayor tiempo de actividad y alimentación, así como a un metabolismo más sostenido durante el día, lo que incrementa la tasa de anabolismo proteico. No obstante, es importante considerar que, si bien el fotoperíodo continuo puede potenciar el crecimiento en el corto plazo, diversos estudios han advertido que exposiciones prolongadas a luz ininterrumpida pueden inducir estrés crónico y alterar otros procesos fisiológicos, como la inmunocompetencia, la osmorregulación y la expresión de genes circadianos (Valenzuela et al., 2006; Esteban et al., 2006).

Este resultado, sin embargo, presenta una aparente contradicción con algunos estudios en *Salmo salar*, descritos en la revisión de Al-Emran et al. (2024), quienes observaron un FCR menos eficiente bajo luz continua, pese a que la ganancia de peso sí fue mayor. No obstante, el mismo trabajo describe variabilidad entre especies bajo el mismo fotoperíodo. En otras especies como el pez cebra (*Danio rerio*), la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) y la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), fotoperíodos largos o continuos han resultado en un FCR más bajo, es decir, mayor eficiencia en la conversión de alimento. Esto refuerza la idea de que la respuesta fisiológica al fotoperíodo puede ser especie-

específica y estar modulada por factores como la edad, el sistema de cultivo, la temperatura y el estado nutricional. Considerando además que los efectos del fotoperíodo sobre el crecimiento suelen manifestarse más claramente en estudios de mayor duración (≥ 90 días), por lo que estos resultados deben interpretarse como una tendencia preliminar que requiere mayor confirmación experimental.

Finalmente, el hecho de que el factor de condición (K) no presentara diferencias significativas entre tratamientos sugiere que, a pesar de las variaciones en crecimiento, la proporción corporal y la condición general de los peces se mantuvo homogénea. Esto indica que los peces no presentaron signos visibles de deterioro físico o desnutrición relativa, lo cual es un indicador favorable de bienestar durante el ensayo.

En conjunto, estos hallazgos refuerzan la utilidad del fotoperíodo como herramienta de manejo productivo en la salmonicultura, pero también destacan la necesidad de un enfoque equilibrado que considere tanto la eficiencia en crecimiento como el mantenimiento de la salud fisiológica a largo plazo.

Eritropoyesis

La eritropoyesis es un proceso que se asocia al equilibrio homeostático, ya que es fundamental para el transporte de oxígeno y nutrientes hacia los distintos tejidos. Si bien, es un proceso de generación constante de células que se renuevan, los tejidos hematopoyéticos siempre cuentan un reservorio de eritrocitos, los cuales se liberan cuando se emite la señal a partir de una necesidad fisiológica. Esto puede ser casos como hipoxia, anemia, hipovolemia, estrés (agudo o crónico) o un aumento en la demanda metabólica que se puede atribuir a múltiples causas. La forma en que este mecanismo se activa revela una alta sensibilidad ante el cambio. Y estudios afirman que factores como la estación, la temperatura y el nivel de oxígeno afectan la formación de eritrocitos (Nikinmaa, 2020).

El fotoperíodo, como un factor ambiental crucial influye significativamente en las funciones fisiológicas, el metabolismo y la función inmune de los organismos acuáticos, especialmente de los salmónidos, sobre los que se sugiere que la regulación circadiana de la producción de melatonina y que solo se controla mediante señales de luz (Falcón & Muñoz-Cueto, 2024).

GATA1 es un factor de transcripción clave, considerado un “regulador maestro” de la eritropoyesis, ya que participa en la generación y maduración de células progenitoras eritroides a lo largo de toda la hematopoyesis (M.C., 1993). El aumento en su expresión observado en todos los grupos tras 45 días de exposición a fotoperíodos artificiales sugiere que los tejidos eritropoyéticos de *Salmo salar* están respondiendo activamente a las nuevas condiciones de luz. Esta alza podría reflejar una activación general del eje eritropoyético inducida por la exposición sostenida a luz artificial, más que una respuesta diferencial específica a una configuración de fotoperíodo en particular.

Por otro lado, la disminución de la expresión observada a los 15 días en el grupo con fotoperíodo LD 12:12, que prácticamente devolvió los niveles de GATA1 a las condiciones iniciales, podría reflejar una estabilización del proceso de maduración

eritropoyética, alcanzando un nuevo equilibrio homeostático. Si bien no se han descrito en peces todos los aspectos del dinamismo de GATA1 frente a cambios ambientales, existen estudios en humanos que muestran que la hipoxia induce una sobreexpresión significativa de este gen, la cual no es permanente, pues bajo condiciones normales de oxígeno, la expresión de GATA1 disminuye, reflejando una regulación transitoria del sistema eritropoyético (Zhang et al., 2012). Con base en esta evidencia, se puede inferir que, frente a una mayor demanda metabólica inicial, GATA1 respondería de manera transitoria, y que, una vez que el organismo se adapta a las nuevas condiciones de luz y se estabiliza la producción de eritrocitos, la señalización para su diferenciación activa disminuye, retornando a niveles basales de mantenimiento.

El incremento en la expresión del gen de la Eritropoyetina (EPO) como la hormona principal que induce la eritropoyesis al promover la autorrenovación, supervivencia y diferenciación de las células eritroides, observado en juveniles de *Salmo salar* ante regímenes de fotoperíodo artificial sugiere una estimulación en la producción de glóbulos rojos inducida por los cambios en el fotoperíodo, esta activación podría estar relacionada con una mayor demanda de oxígeno o ajustes metabólicos, reflejando una estimulación eritropoyética adaptativa. Estudios en trucha arcoíris han demostrado que la EPO renal aumenta durante niveles moderados de hipoxia, mientras el bazo contribuye con eritrocitos circulantes, indicando que la respuesta del sistema eritropoyético se activa incluso antes de una hipoxia severa (Lai et al., 2006). De manera similar, en lubina europea (*Dicentrarchus labrax*), epo y epor se inducen coordinadamente en condiciones de anemia o hipoxia, señalando un mecanismo de adaptación fisiológica (Neves et al., 2016). Revisiones en teleósteos resaltan que la disminución en la proporción oxígeno-demanda es suficiente para activar la eritropoyesis, lo que sugiere que incluso aumentos moderados de EPO pueden representar una respuesta significativa ante un incremento en la demanda metabólica (Chu et al., 2008). La EPO se ve sobre expresada principalmente en condiciones de hipoxia, por lo que, en condiciones de saturación de oxígeno óptimas y controladas, la expresión de este gen es muy baja, por el mismo motivo podría interpretarse como un mecanismo adaptativo más que como una respuesta de emergencia.

Sin embargo, la caída en la expresión hacia el día 60, bajo el concepto general de regulación homeostática, dentro del que habría actuado EPO, indicaría que el sistema estabilizó la producción de eritropoyetina una vez que se alcanzó un nuevo equilibrio fisiológico.

Lo observado en este trabajo, particularmente el aumento transitorio en la expresión de GATA1 y EPO bajo condiciones de luz artificial, podría ser consistente con la activación inicial del eje eritropoyético descrita por Valenzuela et al. (2006), quienes evaluaron los efectos del fotoperíodo constante (LD 24:0) sobre parámetros cualitativos y cuantitativos de los eritrocitos en *Oncorhynchus mykiss*. En dicho estudio se reportó un aumento inicial de eritrocitos inmaduros que sugería una activación temprana de la eritropoyesis, seguido por una disminución en su número y una eventual supresión de la actividad eritropoyética. Aunque este estudio no evaluó directamente parámetros celulares hematológicos, el patrón de activación seguido de descenso transcripcional de EPO resulta coherente con una respuesta fisiológica transitoria, como la descrita en contextos de estimulación inicial compensatoria y posterior estabilización.

Mielopoyesis

La mielopoyesis es un proceso dinámico mediante el cual se generan las células del linaje mieloide, como monocitos/macrófagos y granulocitos, esenciales para la inmunidad innata en peces. Este proceso está regulado por una red de factores de transcripción y receptores de citoquinas que permiten ajustar la producción de células inmunes frente a distintos desafíos fisiológico (Grayfer et al., 2018). Se ha demostrado que el eje PU.1–CSF1R se activa durante procesos inflamatorios o infecciosos, generando una expansión mieloide que refuerza la inmunidad innata (Hason et al., 2022; Hsu et al., 2004; Smith et al., 2021). Esto sugiere que, al igual que en la eritropoyesis, la mielopoyesis en peces puede responder rápidamente ante condiciones fisiológicas desafiantes, como estrés, inflamación o una mayor demanda metabólica, y que tanto PU.1 como CSF1R actúan como sensores y efectores claves en esa respuesta.

PU.1 al igual que GATA1 es un “regulador maestro” en la formación y la diferenciación de células sanguíneas. Cuando se activa PU.1, implica que la célula progenitora hematopoyética deja de ser indiferenciada y se compromete hacia el linaje mieloide, estableciendo una “ventana de oportunidad” regulatoria que permite diferentes destinos celulares más especializados (Jin et al., 2012). Su expresión está altamente conservada en peces, y estudios en *Danio rerio* han mostrado que niveles elevados de PU.1 promueven la mielopoyesis a expensas del linaje eritroide (Rhodes et al., 2005) sugiriendo que actúa como antagonista de GATA1 debido a que actuarían sobre las mismas células madre, llevándolas hacia el linaje mieloide sobre el eritroide (Hsu et al., 2004). Este compromiso de diferenciación no es lineal ni exclusivo; por el contrario, abre múltiples trayectorias posibles dentro de la mielopoyesis, niveles altos de PU.1 serían instructivos para el destino de los macrófagos (aumentando IRF8 y CSF1R), mientras que los niveles bajos de PU.1 son suficientes y necesarios para la especificación de los neutrófilos (regulando C/EBP α) (Jin et al., 2012).

Los resultados mostraron que el grupo bajo fotoperiodo LD 14:10, presentó la mayor expresión de PU.1 en los tiempos T1 y T2, sugiriendo una activación sostenida del

sistema hematopoyético hacia linajes mieloides en estas condiciones (Zhang et al., 2022) lo cual se puede relacionar a un aumento sobre los progenitores de macrófagos, y una reducción en progenitores de neutrófilos (Jin et al., 2012). El aumento en la expresión de este gen observado en el fotoperíodo LD 24:0 si bien fue en menor magnitud, fue una diferencia igualmente significativa con relación al T0. En contraste, el fotoperíodo LD 12:12 mostró niveles mínimos de expresión en todos los tiempos y tratamientos. La condición 12:12 se asociaría con una expresión reducida del gen PU.1, lo que podría reflejar una fase de represión o regulación más estricta del sistema hematopoyético (Hsu et al., 2004) y donde se vería interrumpido el desarrollo de macrófagos, y se mantendría esencialmente la diferenciación de neutrófilos (Jin et al., 2012).

Estos hallazgos indicarían que el fotoperíodo actúa como un modulador clave de la expresión del gen PU.1, promoviendo diferencialmente la activación del sistema hematopoyético mieloides bajo condiciones de luz prolongada. En particular, el régimen de 14:10 LD induciría una activación sostenida de PU.1, lo cual favorecería el compromiso de progenitores hacia el linaje de macrófagos, en detrimento del desarrollo de neutrófilos. Esta respuesta podría estar relacionada con mecanismos de regulación circadiana y epigenética de la inmunidad innata, en los que el fotoperíodo influye sobre la programación transcripcional de células mieloides (Orozco-Solis & Aguilar-Arnal, 2020). En contraste, el fotoperíodo 12:12 parece mantener una expresión basal o reprimida de PU.1, posiblemente asociada a un balance inmunológico más conservador, donde se preservaría preferentemente el desarrollo de neutrófilos y se limitaría la diferenciación de macrófagos.

El receptor del factor estimulante de colonias 1 (CSF1R) también cumple un rol esencial al mediar la señalización de citoquinas como M-CSF, favoreciendo la supervivencia, proliferación y diferenciación de monocitos/macrófagos (Hason et al., 2022). En este trabajo, las únicas diferencias significativas de expresión de CSF1R en tiempo 1 estuvieron en los grupos expuestos a LD 12:12 y LD 14:10, los que presentaron una disminución en la expresión del gen, mientras que el grupo LD 24:0 parece mostrar una leve tendencia al aumento que no resulta significativa respecto del tiempo 0.

Pasados los 15 días en fotoperíodo LD 12:12 para todos, la expresión relativa mostró una tendencia similar en los tres grupos, con una leve disminución, que se acentuó más en el grupo LD 24:0, lo que estaría sugiriendo un efecto residual en los grupos LD 12:12 y LD 14:10. Considerando este patrón de expresión, se puede interpretar que aunque PU.1 se encuentra activado bajo fotoperíodos prolongados como LD 14:10, esto no necesariamente se traduce en una activación completa del linaje mielóide en términos funcionales. La baja expresión de CSF1R en dichos tratamientos podría reflejar que el sistema hematopoyético se encuentra en una fase temprana de compromiso transcripcional hacia células mieloides, sin que ello implique aún una expansión activa de macrófagos. Esta situación podría deberse a la ausencia de estímulos inmunológicos específicos que normalmente inducen una fuerte señalización a través de CSF1R, como ocurre en contextos de infección o inflamación (Liu et al., 2022). Así, bajo estas condiciones de fotoperíodo, el sistema inmune innato podría encontrarse en un estado de preparación basal o priming (Zapata et al., 2006), en el que ciertos linajes comienzan a ser favorecidos a nivel transcripcional, pero sin alcanzar una activación completa ni una expresión elevada de genes funcionales terminales (Grayfer et al., 2018; Rieger et al., 2015). Esto resulta especialmente evidente en el fotoperíodo 12:12, donde tanto PU.1 como CSF1R se expresan a niveles bajos, sugiriendo un escenario más estable o conservador del sistema inmune.

7. CONCLUSIONES

1. La exposición prolongada a fotoperíodos artificiales aumentó transitoriamente la expresión de GATA1 y EPO en juveniles de *Salmo salar*, indicando activación del eje eritropoyético dependiente del estímulo lumínico sostenido, pero no necesariamente de la configuración horaria.
2. El fotoperíodo de luz continua promovió visiblemente la activación del sistema eritropoyético a los 45 días de exposición, evidenciada por una sobreexpresión inicial de GATA1 y EPO, seguida de una estabilización al cambiar a fotoperíodo cíclico LD 12:12, lo que sugiere un proceso de adaptación fisiológica. Esto coincide con lo observado por Valenzuela et al. 2006 en su evaluación cuantitativa y cualitativa de células sanguíneas, reconociendo en ambos casos un aumento en la activación de la eritropoyesis en esta configuración de fotoperíodo.
3. No hubo diferencias significativas entre fotoperíodos en la expresión eritropoyética, por lo que se rechaza la hipótesis de modulación diferencial de la expresión génica hacia estos linajes por influencia del fotoperíodo. Sin embargo, la luz artificial prolongada activa transitoriamente el eje eritropoyético, evidenciando respuesta fisiológica al cambio ambiental.
4. La expresión de PU.1 fue mayor bajo fotoperíodos prolongados (LD 24:0 y LD 14:10), sugiriendo un favorecimiento transcripcional sostenido del linaje mieloide. En contraste los niveles bajos observados en LD 12:12, son consistentes con una menor presión sobre el sistema mielopoyético y una posible mantención de un equilibrio inmunológico basal más conservador.
5. La modulación de CSF1R fue menos pronunciada, indicando que la activación funcional de macrófagos podría estar limitada sin estímulos inmunológicos fuertes. Las diferencias entre PU.1 y CSF1R reflejan etapas distintas en la diferenciación mieloide, requiriendo más estudios para evaluar su impacto funcional.

BIBLIOGRAFÍA

- Aihua, Z., & Yan, X. (2024). Erythropoiesis in Teleost Fishes: The Fantastic Biological Process. *Reviews in Aquaculture*, 17. <https://doi.org/10.1111/raq.12960>
- Al-Emran, M., Zahangir, M. M., Badruzzaman, M., & Shahjahan, M. (2024). Influences of photoperiod on growth and reproduction of farmed fishes - prospects in aquaculture. *Aquaculture Reports*, 35, 101978. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2024.101978>
- Biswas, A. K., Morita, T., Yoshizaki, G., Maita, M., & Takeuchi, T. (2005). Control of reproduction in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) by photoperiod manipulation. *AQUACULTURE*, 243(1–4), 229–239. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.10.008>
- Chu, C.-Y., Cheng, C.-H., Yang, C.-H., & Huang, C.-J. (2008). Erythropoietins from teleosts. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(22), 3545–3552. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8231-y>
- Churova, M. V, Shulgina, N., Kuritsyn, A., Krupnova, M. Yu., & Nemova, N. N. (2020). Muscle-specific gene expression and metabolic enzyme activities in Atlantic salmon *Salmo salar* L. fry reared under different photoperiod regimes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 239, 110330. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2019.110330>
- Esteban, M. A., Cuesta, A., Rodriguez, A., & Meseguer, J. (2006). Effect of photoperiod on the fish innate immune system: a link between fish pineal gland and the immune system. *JOURNAL OF PINEAL RESEARCH*, 41(3), 261–266. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2006.00362.x>
- Falcón, J. (1999). Cellular circadian clocks in the pineal. *Progress in Neurobiology*, 58(2), 121–162. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(98\)00078-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00078-1)
- Falcón, J., & Muñoz-Cueto, J. A. (2024). The Pineal Gland and Photoperiodism in Fish. In *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-443-21477-6.00164-4>
- FAO. (2024). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2024. La transformación azul en acción*. (FAO).

- Grayfer, L., Kerimoglu, B., Yaparla, A., Hodgkinson, J. W., Xie, J., & Belosevic, M. (2018). Mechanisms of Fish Macrophage Antimicrobial Immunity. *Frontiers in Immunology, Volume 9-2018*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01105>
- Handeland, S. O., & Stefansson, S. (2001). Photoperiod control and influence of body size on off-season parr-smolt transformation and post-smolt growth. *Aquaculture, 192*, 291–307. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00457-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00457-9)
- Hason, M., Mikulasova, T., Machonova, O., Pombinho, A., van Ham, T. J., Irion, U., Nüsslein-Volhard, C., Bartunek, P., & Svoboda, O. (2022). M-CSFR/CSF1R signaling regulates myeloid fates in zebrafish via distinct action of its receptors and ligands. *Blood Advances, 6*(5), 1474–1488. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021005459>
- Henchion, M., Hayes, M., Mullen, A. M., Fenelon, M., & Tiwari, B. (2017). Future Protein Supply and Demand: Strategies and Factors Influencing a Sustainable Equilibrium. *Foods, 6*(7). <https://doi.org/10.3390/foods6070053>
- Hoggatt, J., & Pelus, L. M. (2013). Hematopoiesis. In S. Maloy & K. Hughes (Eds.), *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)* (pp. 418–421). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00686-0>
- Hsu, K., Traver, D., Kutok, J. L., Hagen, A., Liu, T.-X., Paw, B. H., Rhodes, J., Berman, J. N., Zon, L. I., Kanki, J. P., & Look, A. T. (2004). The pu.1 promoter drives myeloid gene expression in zebrafish. *Blood, 104*(5), 1291–1297. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-09-3105>
- Jin, H., Li, L., Xu, J., Zhen, F., Zhu, L., Liu, P. P., Zhang, M., Zhang, W., & Wen, Z. (2012). Runx1 regulates embryonic myeloid fate choice in zebrafish through a negative feedback loop inhibiting Pu.1 expression. *Blood, 119*(22), 5239–5249. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-12-398362>
- Kondera, E. (2019). Haematopoiesis and haematopoietic organs in fish. *Roczniki Naukowe Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego, 15*, 9–16. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0013.4535>
- Lai, J. C. C., Kakuta, I., Mok, H. O. L., Rummer, J. L., & Randall, D. (2006). Effects of moderate and substantial hypoxia on erythropoietin levels in rainbow trout kidney and spleen. *Journal of Experimental Biology, 209*(14), 2734–2738. <https://doi.org/10.1242/jeb.02279>

- Li, H., Liang, Z., Ding, G., Shi, L., Xu, F., & Cai, H. (2016). A Natural Light/Dark Cycle Regulation of Carbon-Nitrogen Metabolism and Gene Expression in Rice Shoots. *Frontiers in Plant Science, Volume 7-2016*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01318>
- Li, X., Wei, P., Liu, S., Tian, Y., Ma, H., & Liu, Y. (2021). Photoperiods affect growth, food intake and physiological metabolism of juvenile European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *AQUACULTURE REPORTS*, 20. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100656>
- Liu, M., Yang, X., Zeng, C., Zhao, H., Li, J., Hou, Z., & Wen, H. (2022). Transcriptional Signatures of Immune, Neural, and Endocrine Functions in the Brain and Kidney of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Response to *Aeromonas salmonicida* Infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3). <https://doi.org/10.3390/ijms23031340>
- Maitra, S. K., Seth, M., & Chattorai, A. (2012). Photoperiod, pineal photoreceptors and melatonin as the signal of photoperiod in the regulation of reproduction in fish. *Journal of Endocrinology and Reproduction*, 10, 73–87.
- M.C., S. (1993). Transcription factor GATA-1 and erythroid development. *Journal of Cellular Biochemistry*, 202(19), 277–284.
- Mera Reina, C., Roa Lara, A., & Ramírez Clavijo, S. (2007). Células madre hematopoyéticas, generalidades y vías implicadas en sus mecanismos de auto-renovación. *Revista Ciencias de La Salud*, 5, 67–89.
- Naylor, R., Troell, M., Little, D., Hardy, R., Bush, S., Shumway, S., Lubchenco, J., Cao, L., Klinger, D., & Buschmann, A. (2021). A 20-Year Retrospective Review of Global Aquaculture. *Nature*, 591, 551. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03308-6>
- Neves, J. V., Caldas, C., Ramos, M. F., & Rodrigues, P. N. S. (2016). Hepcidin-Dependent Regulation of Erythropoiesis during Anemia in a Teleost Fish, *Dicentrarchus labrax*. *PLOS ONE*, 11(4), e0153940-. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153940>
- Nikinmaa, M. (2020). Environmental regulation of the function of circulating erythrocytes via changes in age distribution in teleost fish: Possible mechanisms and significance. *Marine Genomics*, 49, 100717. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.margen.2019.100717>
- Oltova, J., Svoboda, O., & Bartunek, P. (2018). Hematopoietic Cytokine Gene

Duplication in Zebrafish Erythroid and Myeloid Lineages. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, Volume 6-2018. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00174>

Orozco-Solis, R., & Aguilar-Arnal, L. (2020). Circadian Regulation of Immunity Through Epigenetic Mechanisms. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, Volume 10-2020. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00096>

Osnato, M., Cota, I., Nebhnani, P., Cereijo, U., & Pelaz, S. (2022). Photoperiod Control of Plant Growth: Flowering Time Genes Beyond Flowering. *Frontiers in Plant Science*, Volume 12-2021. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.805635>

Pino Martinez, E., Balseiro, P., Fleming, M. S., Stefansson, S. O., Norberg, B., Imsland, A. K. D., & Handeland, S. O. (2023). Interaction of temperature and photoperiod on male postsmolt maturation of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 568, 739325. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739325>

Rhodes, J., Hagen, A., Hsu, K., Deng, M., Liu, T. X., Look, A. T., & Kanki, J. P. (2005). Interplay of Pu.1 and Gata1 Determines Myelo-Erythroid Progenitor Cell Fate in Zebrafish. *Developmental Cell*, 8(1), 97–108. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.11.014>

Rieger, A. M., Havixbeck, J. J., Belosevic, M., & Barreda, D. R. (2015). Teleost soluble CSF-1R modulates cytokine profiles at an inflammatory site, and inhibits neutrophil chemotaxis, phagocytosis, and bacterial killing. *Developmental & Comparative Immunology*, 49(2), 259–266. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.12.003>

Seibel, H., Baßmann, B., & Rebl, A. (2021). Blood Will Tell: What Hematological Analyses Can Reveal About Fish Welfare. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 616955. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.616955>

SERNAPESCA. (2019). Guía de referencia para evaluación de lesiones en salmónidos. In *Manual de Inocuidad y Certificación*. Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura.

SERNAPESCA. (2020). *Programa para la optimización del uso de antimicrobianos “PROA SALMON.”* Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura.

Smith, N. C., Umasuthan, N., Kumar, S., Woldemariam, N. T., Andreassen, R., Christian, S. L., & Rise, M. L. (2021). Transcriptome Profiling of Atlantic Salmon Adherent Head Kidney Leukocytes Reveals That Macrophages Are Selectively Enriched During Culture. *Frontiers in Immunology*, 12, 709910.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.709910>

SUBPESCA. (2025). *Informe Sectorial de Pesca y Acuicultura*.

Turker, A., & Yildirim, O. (2011). Interrelationship of Photoperiod with Growth Performance and Feeding of Seawater Farmed Rainbow Trout, (*Oncorhynchus mykiss*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *11*, 393–397. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v11_3_08

Tveterås, R., Misund, B., Aponte, F., & Pincinato, R. (2023). *Regulation of salmon aquaculture towards 2030: Incentives, economic performance and sustainability*.

Valenzuela, A. E., Silva, V. M., & Klempau, A. E. (2006). Qualitative and quantitative effects of constant light photoperiod on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) peripheral blood erythrocytes. *AQUACULTURE*, *251*(2–4), 596–602. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.06.012>

Vera, L. M., Davie, A., Taylor, J. F., & Migaud, H. (2010). Differential light intensity and spectral sensitivities of Atlantic salmon, European sea bass and Atlantic cod pineal glands ex vivo. *General and Comparative Endocrinology*, *165*(1), 25–33. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.05.021>

Ytrestøyl, T., Hjelle, E., Kolarevic, J., Takle, H., Rebl, A., Afanasyev, S., Krasnov, A., Brunsvik, P., & Terjesen, B. F. (2023). Photoperiod in recirculation aquaculture systems and timing of seawater transfer affect seawater growth performance of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of the World Aquaculture Society*, *54*(1), 73–95. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jwas.12880>

Zapata, A., Diez, B., Cejalvo, T., Gutiérrez-de Frías, C., & Cortés, A. (2006). Ontogeny of the immune system of fish. *Fish & Shellfish Immunology*, *20*(2), 126–136. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.005>

Zhang, F.-L., Shen, G.-M., Liu, X.-L., Wang, F., Zhao, Y.-Z., & Zhang, J.-W. (2012). Hypoxia-inducible factor 1-mediated human GATA1 induction promotes erythroid differentiation under hypoxic conditions. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *16*(8), 1889–1899. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01484.x>

Zhang, G., Ye, Z., Jiang, Z., Wu, C., Ge, L., Wang, J., Xu, X., Wang, T., & Yang, J. (2024). Circadian patterns and photoperiodic modulation of clock gene expression and neuroendocrine hormone secretion in the marine teleost *Larimichthys crocea*.

Chronobiology International, 41(3), 329–346.

<https://doi.org/10.1080/07420528.2024.2315215>

Zhang, X.-Y., Zhuo, X., Cheng, J., Wang, X., Liang, K., & Chen, X. (2022). PU.1 Regulates Cathepsin S Expression in Large Yellow Croaker (*Larimichthys crocea*) Macrophages. *Frontiers in Immunology*, Volume 12-2021.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.819029>

Zhong, A., Wang, Y., Zhang, H., Yan, X., & Jia, S. (2025). Histological and transcriptome analysis provides new insights into the hematopoietic and immune functions of head kidney, trunk kidney and spleen of adult large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. *Comparative Immunology Reports*, 8, 200223.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cirep.2025.200223>

ANEXOS

ANEXO N°1

Protocolo extracción de ARN con reactivo TRIzol.

Las muestras o tejidos fueron almacenadas en 500uL de RNAlater. Luego fueron homogenizadas en 1 mL de TRIzol Reagent (Invitrogen, USA). 200 μ L de cloroformo se añadirán a cada tubo. Después de mezclar, las muestras se incubaron por 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12000 g por 15 minutos a 4°C. La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo y se agregaron 500 μ L de isopropanol a cada tubo. Las muestras fueron incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12000 g por 10 minutos a 4°C. El pellet se lavó tres veces con 1 mL de etanol al 75%, centrifugando a 7500g por 5 minutos a 4°C. El pellet se secó a temperatura ambiente durante 10 minutos y fue resuspendido en 50 μ L de agua libre de nucleasas.

ANEXO N°2

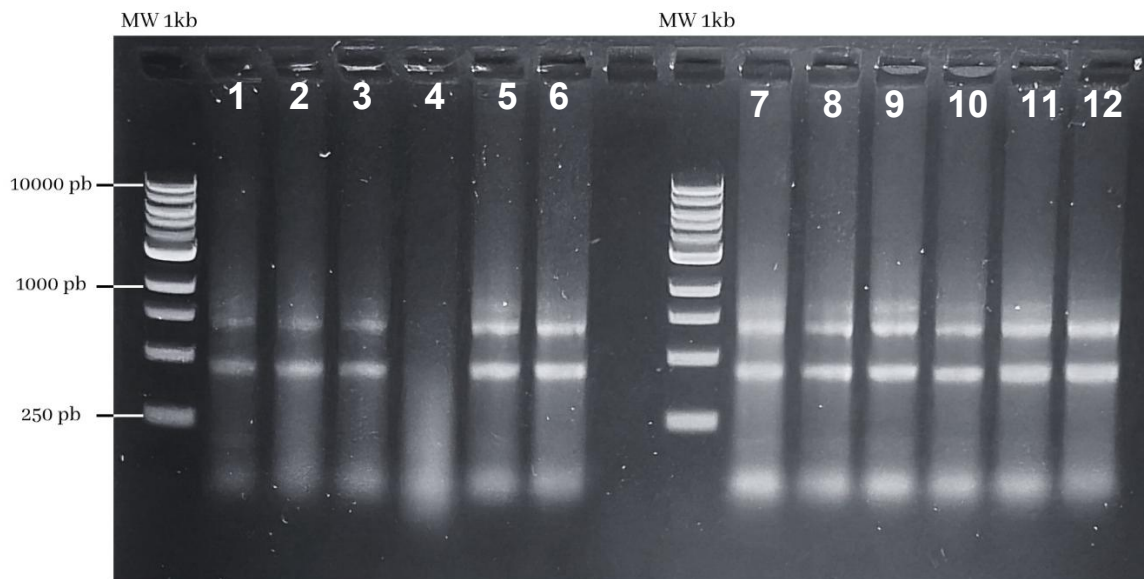
Concentraciones e índice de pureza obtenidos del aislamiento de ARN a partir de tejido de riñón anterior

Name	260/280	ng/ μ L
T0 24:0 TK1 M1	2,011	462,093
T0 24:0 TK1 M2	1,957	233,569
T0 24:0 TK1 M3	1,979	228,842
T0 24:0 TK2 M4	2,039	1051,413
T0 24:0 TK2 M5	2,021	797,474
T0 24:0 TK2 M6	2,025	766,278
T0 12:12 TK8 M7	2,026	459,036
T0 12:12 TK8 M8	1,945	482,626
T0 12:12 TK8 M9	2,01	522,47
T0 12:12 TK10 M10	1,989	704,683
T0 12:12 TK10 M11	2,034	614,444
T0 12:12 TK10 M12	1,946	227,917
T0 14:10 TK11 M13	2,026	570,483
T0 14:10 TK11 M14	1,93	642,937
T0 14:10 TK11 M15	2,025	583,478
T0 14:10 TK12 M16	1,997	565,944
T0 14:10 TK12 M17	1,952	543,368
T0 14:10 TK12 M18	1,998	391,275
T1 24:0 TK1 M1	2,009	1089,083
T1 24:0 TK1 M2	2,021	1079,599
T1 24:0 TK1 M3	2,009	1119,353
T1 24:0 TK2 M4	2,002	1005,335
T1 24:0 TK2 M5	1,965	809,886
T1 24:0 TK2 M6	2,008	873,84
T1 12:12 TK8 M7	1,978	1240,977
T1 12:12 TK8 M8	1,954	1029,376
T1 12:12 TK8 M9	1,962	1113,25
T1 12:12 TK10 M10	2	1189,067
T1 12:12 TK10 M11	2,007	1049,934
T1 12:12 TK10 M12	2,034	1206,371
T1 14:10 TK11 M13	2,037	1345,392
T1 14:10 TK11 M14	2,008	1777,303
T1 14:10 TK11 M15	1,924	900,983
T1 14:10 TK12 M16	1,984	655,236
T1 14:10 TK12 M17	2,012	1014,869
T1 14:10 TK12 M18	2,032	997,655
T2 24:0 TK1 M1	2,053	1145,708
T2 24:0 TK1 M2	2,053	825,511
T2 24:0 TK1 M3	2,071	875,715
T2 24:0 TK2 M4	2,045	656,985
T2 24:0 TK2 M5	2,139	1308,8
T2 24:0 TK2 M6	2,072	926,713
T2 12:12 TK8 M8	2,011	1156,263
T2 12:12 TK8 M9	1,999	1238,846
T2 12:12 TK10 M10	2,021	1074,742
T2 12:12 TK10 M11	2,015	1361,145
T2 12:12 TK10 M12	1,972	934,345
T2 14:10 TK11 M13	2,036	1448,53
T2 14:10 TK11 M14	2,025	1384,854
T2 14:10 TK11 M15	2,019	1163,855
T2 14:10 TK12 M16	2,026	1172,608
T2 14:10 TK12 M17	2,007	1060,994
T2 14:10 TK12 M18	2,036	1348,869

ANEXO N°3

Gel de agarosa para evaluación de integridad de ARN

Criterio de integridad para ARN extraído a partir de tejido de riñón anterior. Gel elaborado con TAE 1X con agarosa al 1%. Sembrado con 300ng de cada muestra de Tiempo 0 del fotoperíodo LD 24:0. Se consideraron integras todas las muestras a excepción de la muestra N°4, la cual se consideró degradada y fue repetida la extracción. Se utilizó un marcador de peso molecular de 1Kb (New England Biolabs #N3232S)



ANEXO N°4

Protocolo DNasa I de New England Biolabs

A Typical DNase I Reaction Protocol (M0303)

1. Preparar la siguiente mezcla de reacción en hielo:

COMPONENTES	Reacción de 10 µl
RNA	2 µg
DNase I Reaction Buffer (10X)	1 µl
DNase I (RNase-free)	0,5 µl
RiboLock RNase Inhibitor	0,5 µl
Nuclease-free H ₂ O	Hasta 10 µl

2. Incubar a 37°C por 10 minutos.
3. Añadir 1 µl de EDTA 50 mM.
4. Inactivar enzimáticamente calentando a 75 °C durante 10 minutos.

ANEXO N°5

Protocolo para RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) modificado para el mínimo volumen de reacción.

I. Síntesis de la primera cadena de cDNA

Después de descongelar, mezclar y centrifugar brevemente los componentes del kit, conservar en hielo.

1. Agregar los siguientes reactivos en un tubo estéril libre de nucleasas (en hielo)

Componente	Volumen
Primer hexámero aleatorio	1 μ L
5X Reaction Buffer	4 μ L
10 mM dNTP Mix	2 μ L
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/ μ L)	0,5 μ L
RevertAid M-MuLV RT (200 U/ μ L)	1 μ L
Agua libre de nucleasas	0,5 μ L
ARN	11 μ L

Volumen total: 20 μ L

4. Mezclar suavemente y centrifugar brevemente.

5. Incubar 5 min a 25 °C, seguido de 60 min a 42 °C.

6. Terminar la reacción calentando a 70 °C durante 5 minutos.

El producto de la transcripción reversa puede utilizarse directamente en aplicaciones de PCR o almacenarse a -20 °C por menos de una semana. Para almacenamiento a largo plazo, se recomienda -70 °C.

ANEXO N°6

Protocolo PCR convencional

Preparación del mix de reacción

1. Descongelar el GoTaq® Green Master Mix a temperatura ambiente. Mezclar bien mediante vórtex y centrifugar brevemente para decantar.
2. Preparar la mezcla de reacción sobre hielo, añadiendo los reactivos en el orden indicado.
3. Preparación del mix (20 µL):

Componente	Volumen
GoTaq® Green Master Mix	5 µL
Primer forward (10 µM)	1 µL
Primer reverse (10 µM)	1 µL
cDNA	1 µL
Agua libre de nucleasas	2 µL

4. Colocar los tubos en el termociclador precalentado a 95 °C.
5. Ejecutar el programa de PCR con los parámetros térmicos estándar del experimento (según producto esperado y T_m de los primers).

Guía general para la amplificación en termociclador

A. Desnaturalización

Se sigue la desnaturalización inicial recomendada de 2 minutos a 95 °C.

Las desnaturalizaciones subsiguientes se realizan durante 1 minuto a 95 °C en cada ciclo.

B. Alineamiento (Annealing)

La temperatura de alineamiento se definió en la estandarización de primers a 58°C.

La duración del alineamiento es de 30 segundos.

C. Extensión

La extensión se realiza a 72°C que es la temperatura óptima para la Taq polimerasa, con una duración de 30 segundos.

Se incluye una extensión final de 5 minutos a 72 °C al final del programa de amplificación.

D. Refrigeración

Se programa el termociclador para mantener los tubos a 4°C al finalizar el programa, esto para minimizar cualquier actividad enzimática residual.

E. Número de ciclos

En la mayoría de los casos, 25–30 ciclos son suficientes para obtener una amplificación adecuada del producto deseado. En este caso se realizaron 35 ciclos.

ANEXO N°7

Protocolo RT-qPCR para el kit Brilliant II SYBR® Green qPCR Master Mix (Agilent Technologies).

1. Preparar el Master Mix:

Descongelarlo y mantenerlo en hielo.

Evitar congelarlo y descongelarlo muchas veces.

Trabajar en lo posible con baja luz o tapado con papel aluminio.

2. Armar la reacción qPCR (25 µl totales):

Agrega los componentes en este orden:

Componente	Volumen
SYBR Green Master Mix	5 µL
Primer forward (10 µM)	2 µL
Primer reverse (10 µM)	2 µL
cDNA	2 µL
Agua libre de nucleasas	1 µL

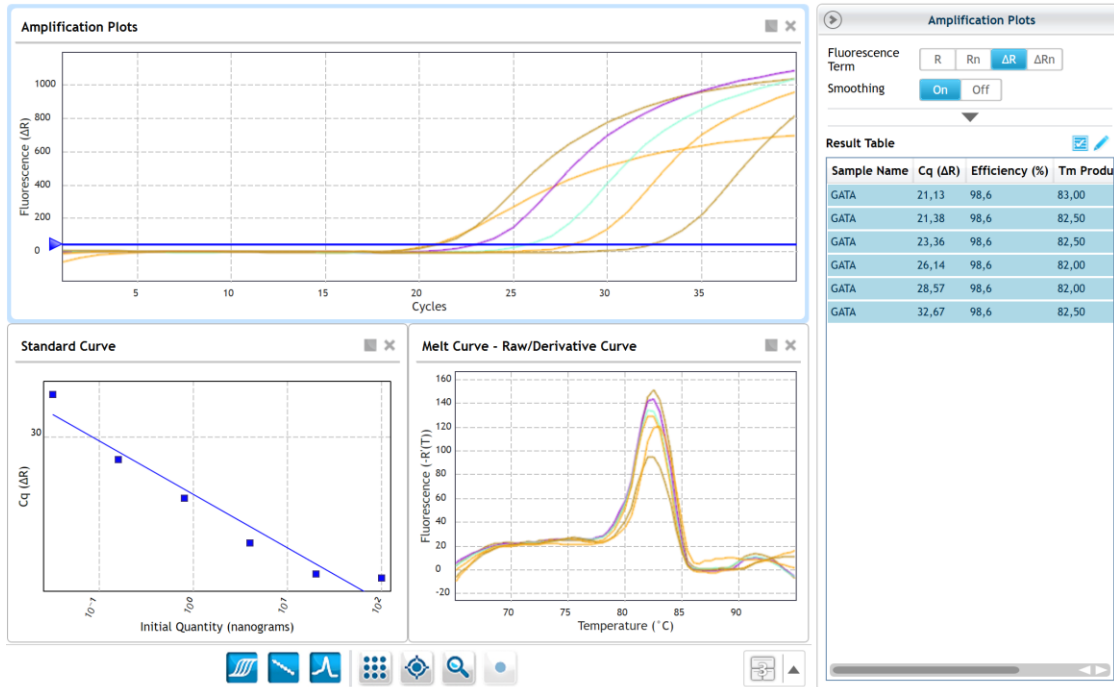
3. Centrifugar brevemente los tubos/placas. Esto junta todos los reactivos al fondo y elimina burbujas que podrían afectar el lector.

4. Coloca la placa de reacción en el equipo e iniciar el programa de RT-qPCR correspondiente.

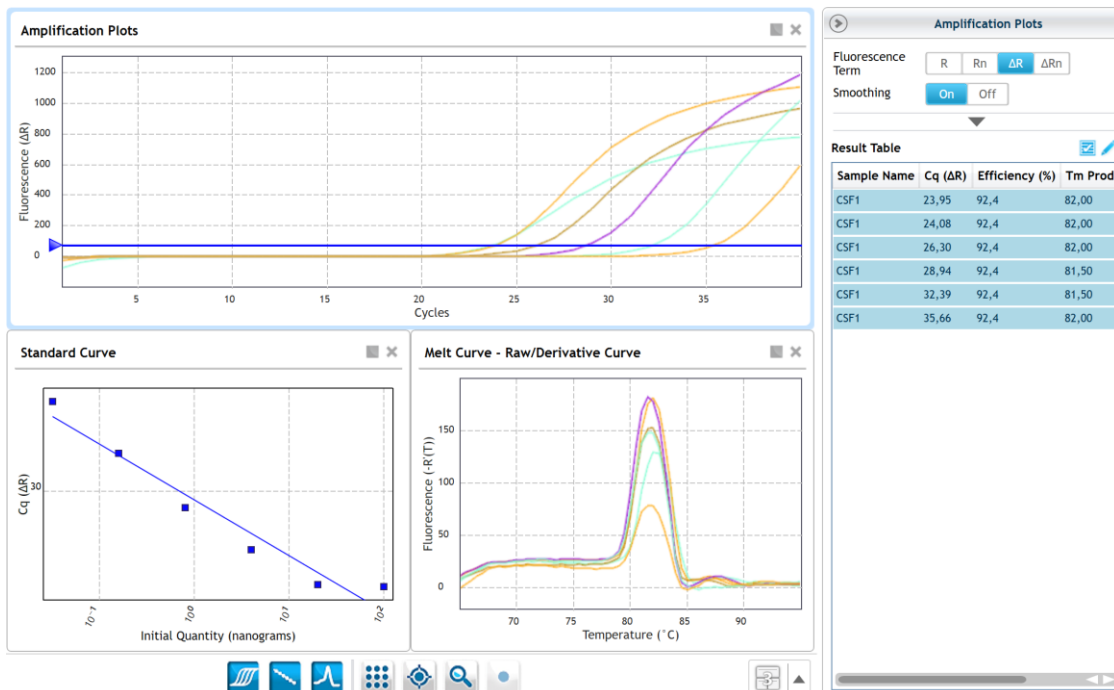
ANEXO N°8

Curvas de rango dinámico obtenidas para cada partidor en el proceso de estandarización.

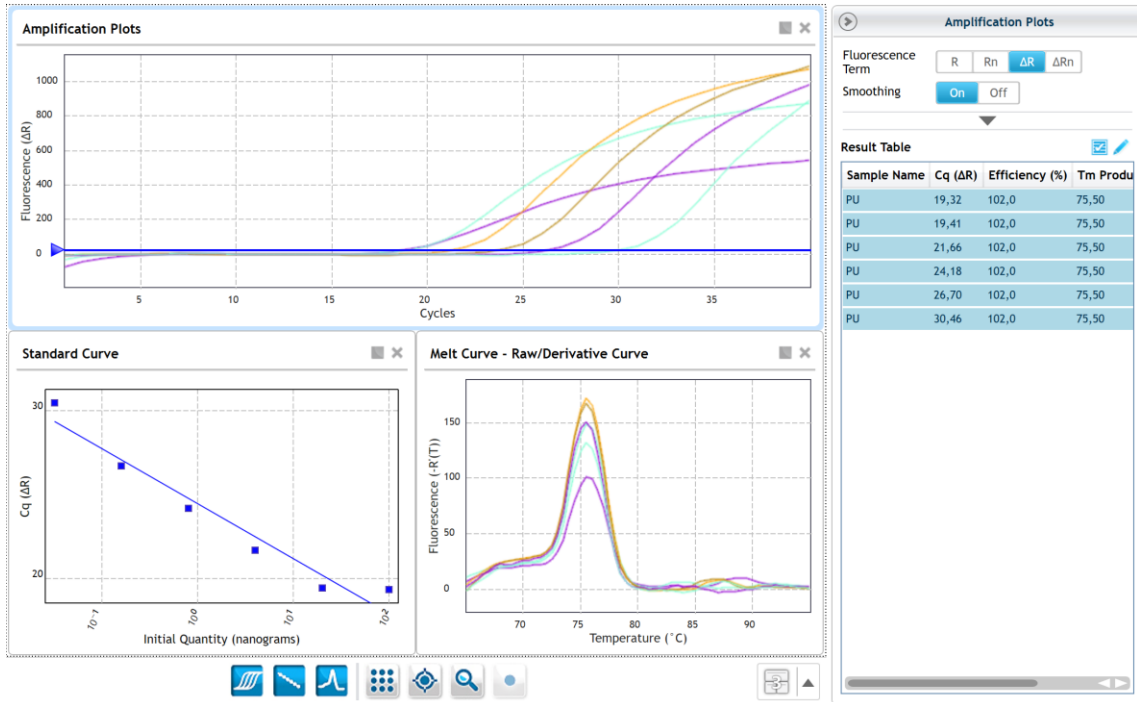
GATA1



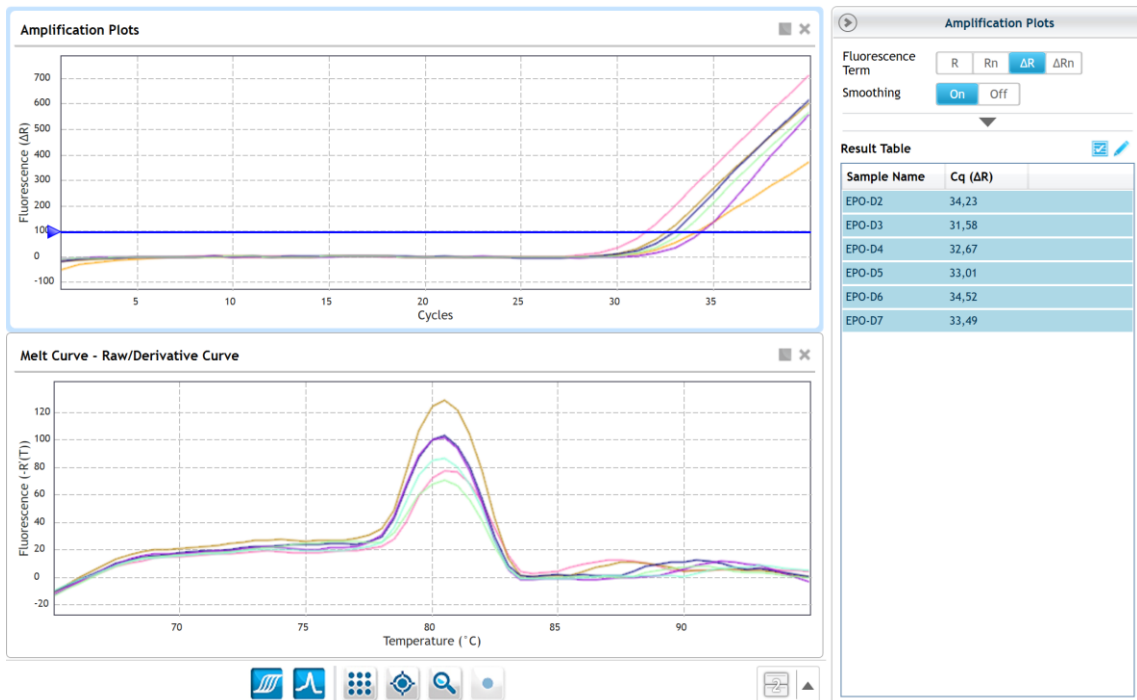
CSF1R



PU.1



EPO



La temperatura de melting para EPO no se mostró en el equipo por lo que estos datos fueron exportados y la curva y cálculo de eficiencia se realizó en Excel.