



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES
INVOLUCRADOS EN LA RESPUESTA A LA
VARIACIÓN AMBIENTAL DIURNA Y ESTACIONAL
EN EL PEZ CRÍPTICO ARRECIFAL *Lythrypnus dalli*
(Gilbert 1890).**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biología Marina)

P r e s e n t a

Priscila Conde Guerrero

La Paz, Baja California Sur, abril de 2019.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10 horas del día 11 del Mes de Marzo del 2019, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Expresión diferencial de genes involucrados en la respuesta a la variación ambiental diurna y estacional en el pez críptico arrecifal *Lythrypnus dalli* (Gilbert 1890)."

Presentada por el alumno:

Priscila Conde Guerrero

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **BIOLOGÍA MARINA**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA



Dra. Tania Zenteno Savín
Co-Directora de Tesis



Dra. Crisalejandra Rivera Pérez
Co-Directora de Tesis



Dr. Fausto Valenzuela Quiñonez
Co-Tutor de Tesis



Dr. Juan Antonio de Anda Montañez
Co-Tutor de Tesis



Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dra. Tania Zenteno Savín

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Co-Director de Tesis

Dra. Crisalejandra Rivera Pérez

CONACyT - Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Co-Director de Tesis

Dr. Fausto Valenzuela Quiñonez

CONACyT - Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Tutor de Tesis

Dr. Juan Antonio de Anda Montañez

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Tutor de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dra. Tania Zenteno Savín

Dra. Crisalejandra Rivera Pérez

Dr. Fausto Valenzuela Quiñonez

Dr. Juan Antonio de Anda Montañez

Jurado del Examen

Dra. Tania Zenteno Savín

Dra. Crisalejandra Rivera Pérez

Dr. Fausto Valenzuela Quiñonez

Suplente

Dr. Juan Antonio de Anda Montañez

Resumen

Las zonas costeras arrecifales están sujetas a cambios dinámicos en factores ambientales (temperatura, oxígeno disuelto, salinidad, pH, etc.) que pueden influir en las respuestas fisiológicas de los organismos marinos. Esta variación puede ocurrir en una escala temporal diurna o estacional y requiere de respuestas de aclimatación rápidas y específicas que, a nivel molecular, pueden estar facilitadas por la inducción de la expresión génica. Los ritmos circadianos permiten, a su vez, ajustar estos cambios recurrentes y sincronizarlos con sus procesos fisiológicos. Los peces crípticos son un componente importante en los sistemas de arrecife, a pesar de ello, se conoce poco sobre su respuesta fisiológica y molecular. El objetivo del presente estudio fue analizar si la variabilidad de los factores abióticos (temperatura, oxígeno disuelto, salinidad) y bióticos (ritmo circadiano) afecta la expresión de los genes de respuesta en peces crípticos. El modelo de estudio fue *Lythrypnus dalli* un gobio críptico arrecifal que habita aguas someras a lo largo del Golfo de California y presenta una gran fidelidad a su hábitat. Las muestras fueron recolectadas mediante buceo SCUBA durante un ciclo diurno, en temporada cálida y fría. La medición de parámetros ambientales mostró una marcada estacionalidad; principalmente en la temperatura, la cual tuvo un incremento de 6°C durante la temporada cálida. Por el contrario, se observó una variación mínima en estos parámetros durante el ciclo diurno (e.g. la temperatura tuvo una variación de 1°C). Los niveles de expresión de genes asociados con la temperatura (*hsp70*), hipoxia (*hif1 α*), estrés oxidativo (*mn-sod*) y el ciclo circadiano (*clock*, *cry1*, *per2*) serían determinados mediante la técnica de qPCR; sin embargo, sólo se logró amplificar el gen *hsp70*. Los niveles de expresión de este gen mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre temporadas, asociadas a los cambios térmicos estacionales. No se encontraron diferencias significativas en la expresión de *hsp70* a lo largo del día ($p > 0.05$). Es posible que *L. dalli* ha desarrollado plasticidad fenotípica que le permite enfrentar la variabilidad ambiental, reflejándose en la modulación de los niveles de expresión de *hsp70* como parte de la respuesta de aclimatación a las condiciones ambientales. De acuerdo a estos resultados, la expresión génica diferencial pudiera estar asociada a la variabilidad ambiental y no a la respuesta endógena del organismo.

Palabras clave: peces crípticos arrecifales, ciclo circadiano, *Lythrypnus dalli*, expresión génica, *hsp70*.



Dra. Tania Zenteno Savín
Vo. Bo. Co-Directora de Tesis

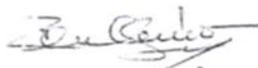


Dra. Crisalejandra Rivera Pérez
Vo. Bo. Co-Directora de Tesis

Summary

Coastal rocky reefs experience dynamic changes in environmental factors (temperature, dissolved oxygen, salinity, etc.), which can influence the physiological responses of marine organisms. These variations could be at a diel or seasonal temporal scale and require quick and specific acclimation responses that, at the molecular level, may be facilitated by the regulation of gene expression. Endogenous circadian clocks allow organisms to adjust these recurring changes in environmental conditions and to synchronize them to their physiological processes. Cryptic reef fishes are an important component in reef systems; however, information about the physiological and molecular response of these species is scarce. The aim of this study was to analyze whether the variability of abiotic (temperature, dissolved oxygen, salinity) and biotic factors (circadian rhythm) affects the expression of response genes in cryptic reef fishes. The study model was an endemic cryptic reef fish (*Lythrypnus dalli*) that inhabits shallow waters throughout the Gulf of California and has high site fidelity. Samples were collected by SCUBA diving during a diel cycle, in a warm and a cold season. Measurement of the physical parameters showed a marked seasonal variation; particularly in temperature, which increase 6°C during the warm season; salinity and oxygen dissolved remain constant. Minimal changes occur during the diurnal cycle, e.g. temperature differ by 1°C. The expression of genes associated with temperature (hsp70), hypoxia (hif1 α), oxidative stress (mn-sod) and the circadian cycle (clock, cry1 and per2) would be quantified by qPCR; however, amplification was achieved only for hsp70. Expression levels increased significant during the warm season ($p < 0.05$), maybe related to seasonal thermal changes. In contrast, no differences were found during the diurnal cycle ($p > 0.05$). *L. dalli* has apparently developed phenotypic plasticity that allows it to face environmental changes, reflected as the modulation of hsp70 expression levels as part of an acclimation response to environmental variability. According to these results, differential gene expression could be associated to the environmental factors and not to the endogenous response of the organism.

Keywords: cryptic reef fish, circadian cycle, *Lythrypnus dalli*, gene expression, hsp70.



Dra. Tania Zenteno Savín
Vo. Bo. Co-Directora de Tesis



Dra. Crisalejandra Rivera Pérez
Vo. Bo. Co-Directora de Tesis

Agradecimientos

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR) por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el soporte económico brindado a través de la beca otorgada No. 782604.

A los proyectos CONACYT Paisaje genómico en el medio marino: Patrones de diversidad adaptativa (CB-2015-01-257524) y un nuevo enfoque para la recuperación, inspección y vigilancia de recursos sobreexplotados de alto valor comercial, caso de estudio: La pesquería de abulón (PNDCPN-2015-01-1743). Así como a la Dirección General de Ordenamiento Pesquero y Acuícola, de la Comisión Nacional de Pesca y Acuicultura por el permiso de pesca de fomento: DGOPA-DAPA-02850/19.

A mi Comité tutorial, por su valiosa asesoría y gran disposición para orientarme. A la Dra. Tania Zenteno Savín, por ser mi guía y estar siempre disponible para resolver cualquier inquietud. Gracias por animarme y por ayudarme a ver el lado positivo a todos los inconvenientes que se presentaban.

A la Dra. Crisalejandra Rivera Pérez por aceptar realizar esta tesis bajo su dirección, ya en una etapa avanzada. Gracias por compartir tu experiencia y conocimientos con mucha paciencia y de la mejor manera; y en general, por toda la dedicación y apoyo brindado a este proyecto.

Al Dr. Fausto Valenzuela Quiñonez, por aceptarme en un principio en su grupo de trabajo y ayudarme a sentar las bases de este proyecto, pero sobre todo por introducirme en el mundo de la Biología Molecular. Al Dr. Juan Antonio de Anda Montañez por apoyarme siempre con los estadísticos, por su disposición y todos los comentarios que enriquecieron este trabajo.

Al equipo de muestreo, Salwa El Khattabi, Camila Mac Loughlin, Raquel Arroyo, Luis Custodio y Fausto Valenzuela por su apoyo para la obtención de muestras. Un doble agradecimiento para la M.C. Salwa El Khattabi por su ayuda en la identificación de todos los peces crípticos obtenidos.

A todos los integrantes del Laboratorio de Genética Molecular; principalmente a la M.C. Delia Rojas Posadas por el gran apoyo que me brindó en todo momento, siempre tan amable y con la mejor disposición. También a mis compañeras Raquel Arroyo y Michelle Leree por compartir conmigo tiempo y espacio en el laboratorio, pero sobre todo por ser un importante apoyo emocional para mí, este logro lo comparto con ustedes.

A mis compañeros y amigos biólogos y no biólogos, Roberto, Pablo, Bernardo, Gina, Diana, Valeria, Fer, Iris, Jorge, Tai, Tony, Víctor, Fernando, Wendy, Nadia, por darme ánimos para terminar este proyecto y porque alguna palabra, idea o sugerencia suya quedó plasmada en este trabajo.

A mi familia, en especial a mis padres por apoyarme siempre y en todos mis proyectos. A mi mamá, por contagiarme siempre con su optimismo y alentarme siempre a lograr lo que me propongo. A Robert, por tu compañía y por todo el cariño, apoyo y paciencia que has tenido conmigo durante todo este tiempo.

Contenido

Resumen.....	i
Summary.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Contenido.....	iv
Lista de figuras.....	vi
Lista de tablas.....	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	7
2.1 Generalidades de los eventos ambientales en sistemas arrecifales	7
2.2 Generalidades de <i>Lythrypnus dalli</i>	8
2.3 Respuesta molecular de peces a condiciones ambientales.....	9
2.3.1 Mecanismo molecular del ciclo circadiano en peces.....	9
2.3.2 Respuesta molecular a variaciones en parámetros ambientales en peces.....	11
3. JUSTIFICACIÓN	14
4. HIPÓTESIS	15
5. OBJETIVOS.....	15
5.1 Objetivo general.....	15
5.2 Objetivos particulares	15
6. MATERIALES Y MÉTODOS	16
6.1 Área de estudio.....	16
6.2 Colecta de organismos	17
6.3 Trabajo en laboratorio.....	17
6.3.1 Extracción de ácido ribonucleico (ARN)	17
6.3.2 Cuantificación y análisis de integridad del ácido ribonucleico (ARN).....	18
6.3.3 Síntesis de ADN de doble cadena complementario (ADNc)	19
6.3.4 Diseño de oligonucleótidos para PCR punto final.....	19
6.3.5 Optimización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final para los genes de interés.....	21

6.3.6	Análisis de la expresión cuantitativa de los genes de respuesta mediante PCR en tiempo real (qPCR)	22
6.4	Análisis de datos	23
6.4.1	Cuantificación relativa por el método de Pfaffl.....	23
7.	RESULTADOS.....	25
7.1	Colecta de organismos	27
7.2	Trabajo de laboratorio	29
7.2.1	Extracción y verificación de ARN total.	29
7.2.2	Optimización de PCR punto final.....	31
7.2.3	Análisis de la expresión cuantitativa mediante PCR en tiempo real (qPCR)	32
8.	DISCUSIÓN	37
9.	CONCLUSIONES.....	44
10.	LITERATURA CITADA	45
11.	ANEXOS	56

Lista de figuras

Figura 1. <i>Lythrypnus dalli</i> (Gilbert 1890) (Tomado de http://blog.reefstudio.es).....	8
Figura 2. Área de estudio, Punta Diablo (24° 18' 45" N y 110° 20' 13" O), Bahía de La Paz, Baja California Sur.	16
Figura 3. Registros de variables físicas del agua a lo largo del día de muestreo en la temporada cálida (octubre 2017) y fría (abril 2018) realizado en Punta Diablo, La Paz, Baja California Sur. a) Temperatura (°C), b) concentración de oxígeno disuelto (mg L ⁻¹) y c) salinidad (ppm) registradas.....	26
Figura 4. Especies crípticas y número de individuos por especie capturados en Punta Diablo, La Paz, Baja California Sur, en temporada cálida (octubre 2017) y fría (abril 2018).	27
Figura 5. Especies presentes en todas las horas de colecta y abundancia por especie en Punta Diablo, La Paz, Baja California Sur, en a) temporada cálida (octubre 2017) y b) fría (abril 2018).	28
Figura 6. Abundancia de <i>Lythrypnus dalli</i> a lo largo del día, en temporada cálida (octubre 2017) y fría (abril 2018) en Punta Diablo, La Paz, Baja California Sur.....	29
Figura 7. Imagen representativa de electroforesis en gel de agarosa/Synergel 1% en TBE-DEPC del ARN total obtenido de 7 muestras de <i>Lythrypnus dalli</i> capturados en Punta Diablo, La Paz, Baja California Sur. La integridad del material genético de las muestras L4f a LA5 se define a partir de la presencia de las subunidades ribosomales (18 y 28s).	30
Figura 8. Perfil electroforético en gel de agarosa/Synergel al 1% en TBE 1X de productos de PCR usando como templado ARN de <i>Lythrypnus dalli</i> muestreados en Punta Diablo, La Paz, Baja California Sur. Línea 1, marcador de peso molecular 1 Kb; líneas 2 a 11, muestras de ARN; línea 12, muestra de ADN como control positivo, línea 13 (-) control negativo. .	30
Figura 9. Productos de amplificación para los genes de interés (hsp70, hif1 α , Mn-sod, clock, cry1 y per2) y el gen de referencia (β -actina) usando como templado ADNc de <i>Lythrypnus dalli</i> capturados en Punta Diablo, La Paz, Baja California Sur. Línea 1: marcador molecular 1 kb; gen 16s, control positivo. Electroforesis en gel de agarosa/Synergel al 1% en TBE 1X. Las flechas indican los productos de interés de acuerdo al tamaño esperado.	31
Figura 10. Curva estándar para el gen de referencia (β -actina). A) Regresión lineal, B) curva de fluorescencia, y C) curva de disociación.	33
Figura 11. Curva estándar para el gen hsp70. A) Regresión lineal, B) curva de fluorescencia y C) curva de disociación.	34
Figura 12. Curvas de disociación obtenida por producto de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para los genes hsp70 (A) y β -actina (B).....	34

Figura 13. Análisis de expresión del gen hsp70 en muestras de *Lythrypnus dalli* capturados en Punta Diablo, La Paz, Baja California Sur en las temporadas cálida (n = 12) y fría (n = 13) mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR). Los valores se muestran como una expresión normalizada en base al gen de referencia (β -actina). Los datos se presentan como mediana y percentiles, mientras que el asterisco indica diferencias significativas ($p < 0.05$).35

Figura 14. Análisis de expresión del gen hsp70 en muestras de *Lythrypnus dalli* capturados en Punta Diablo, La Paz, Baja California Sur, a lo largo del día durante la temporada cálida (n=12), mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR). Los valores se muestran como una expresión normalizada en base al gen de referencia (β -actina). Los datos se presentan como mediana y percentiles.36

Figura 15. Análisis de expresión del gen hsp70 en muestras de *Lythrypnus dalli* a lo largo del día durante la temporada fría (n=13) mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR). Los valores se muestran como una expresión normalizada en base al gen de referencia (β -actina). Los datos se presentan como mediana y percentiles.36

Lista de tablas

Tabla I. Genes de interés y resumen de su función.	20
Tabla II. Oligonucleótidos diseñados a partir de secuencias homólogas reportadas en GenBank (NCBI).	21
Tabla III. Concentración de las diluciones de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) para una curva estándar.	22
Tabla IV. Promedio y desviación estándar de los parámetros ambientales registrados en Punta Diablo, Bahía de La Paz, Baja California Sur durante la temporada cálida (octubre 2017) y la temporada fría (abril 2018).	25
Tabla V. Análisis de identidad de las secuencias de interés de <i>Lythrypnus dalli</i>	32
Tabla VI. Análisis de la eficiencia de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).	32

1. INTRODUCCIÓN

Los arrecifes son estructuras que proporcionan un sustrato favorable para el desarrollo de organismos marinos. Por definición, un arrecife incluye cualquier superficie rocosa sumergida, como las playas de cantos rodados, acantilados, plataformas y arrecifes de coral. Estas estructuras marinas ofrecen una mayor protección en la zona costera respecto al mar abierto, lo que favorece el asentamiento de numerosas especies. Se consideran peces arrecifales aquellos cuya historia de vida está estrechamente ligada al sustrato rocoso con fines de alimentación, protección y/o refugio, pasando parte del tiempo en el arrecife o zonas rocosas (Thomson *et al.*, 2000; Villegas-Sánchez *et al.*, 2009).

De las especies de peces asociadas a los arrecifes, se ha estimado que más del 50% se compone de especies crípticas. Dicha estimación resulta poco precisa dada la naturaleza de las especies crípticas y su difícil identificación; a pesar de ello, se reconoce que las especies crípticas son un componente muy importante de los sistemas arrecifales. Algunas de las características morfológicas y de comportamiento que presentan los peces crípticos, y que dificultan su identificación, son tamaños reducidos (adultos < 10 cm), coloraciones similares al medio, y generalmente se ocultan en grietas, agujeros o estructuras formadas por otros organismos (Galván-Villa, 2008; Stewart y Beukers, 2000; Willis y Anderson, 2003). Algunos peces crípticos que habitan en zonas poco profundas presentan una movilidad limitada estrechamente ligada al arrecife (Stewart y Beukers, 2000).

Los arrecifes tropicales son apropiados para la investigación de fluctuaciones temporales y espaciales en diversas variables ambientales y sus efectos en la flora y fauna que los habita. Por una parte, las zonas costeras son la interfase entre el océano, tierra y la atmósfera; por lo tanto, están sujetas a variaciones provenientes de estas tres fuentes. Por otro lado, el perfil en la zona costera arrecifal puede ser abrupto, lo cual favorece el establecimiento de gradientes fisicoquímicos en relación con la profundidad. En consecuencia, las zonas costeras están sujetas a cambios dinámicos en factores ambientales como temperatura, oxígeno disuelto, salinidad, pH, radiación ultravioleta (UV) (Guadayol *et al.*, 2014; Gunderson *et al.*, 2016).

Las fluctuaciones ambientales pueden ocurrir drásticamente a lo largo de un ciclo diario en el ambiente marino (Kwiatkowski *et al.*, 2016) debido a la influencia de la marea, precipitaciones o la productividad primaria. Esta última puede desencadenar variaciones, por ejemplo, en la concentración de oxígeno disuelto y pH. Además de la fluctuación diaria, también la variación estacional en las condiciones ambientales es significativa. La temperatura es uno de los factores cuya fluctuación estacional es más evidente debido al ciclo anual de la radiación solar, y guarda una interacción estrecha con otros factores abióticos (Gunderson *et al.*, 2016). Durante un ciclo anual, en la Bahía de La Paz, Baja California Sur, se puede presentar una temperatura máxima alrededor de los 30 °C durante el verano, cambiando de forma gradual hasta una temperatura mínima de 20 °C en invierno (Reyes-Salinas *et al.*, 2003; Thomson *et al.*, 2000).

El hábitat submareal, en comparación con el intermareal es menos variable; a pesar de ello, los organismos en este hábitat pueden experimentar fluctuaciones térmicas diurnas y estacionales causadas por las termoclinas, la radiación solar, o por eventos de precipitación (Hofmann, 2005). Estas fluctuaciones térmicas pueden impactar el rendimiento y condición física de los organismos. Adicionalmente, en el ambiente marino pueden haber fluctuaciones térmicas en una microescala espacial, por lo que es importante conocer la respuesta fisiológica y/o molecular de las especies con menor capacidad de movimiento (Hofmann, 2005; Madeira *et al.*, 2012).

Los cambios en la concentración de oxígeno disuelto en el medio pueden reflejar en la respuesta molecular y fisiológica de los organismos. Las tasas variables de consumo y producción de oxígeno pueden dar lugar a variaciones temporales en la concentración de oxígeno. La hipoxia ambiental se define como una concentración menor o igual a 2 mg L⁻¹ de oxígeno disuelto y es el factor ambiental más ampliamente estudiado en los ecosistemas acuáticos (Smith *et al.*, 2012). Fluctuaciones diurnas en la concentración de oxígeno disuelto pueden ocurrir como resultado de los procesos de fotosíntesis y respiración que llevan a cabo las algas y bacterias, aunque la estratificación vertical que resulta de la formación de haloclinas, termoclinas, y la entrada excesiva de nutrientes y materia orgánica de origen antropogénico también pueden resultar en eventos hipóxicos. Las concentraciones de

oxígeno disuelto son generalmente menores durante las primeras horas del día debido a que la respiración ocurre durante la noche y hay un cese en la producción de oxígeno vía fotosíntesis (Richards, 2011).

La variación en los factores ambientales es determinante en la distribución de las especies e incluso un promotor de la biodiversidad, ya que da lugar a variaciones genéticas y fenotípicas (Culumber *et al.*, 2012). Los organismos marinos se adaptan a los cambios dinámicos en el ambiente que prevalecen en su ambiente natural. Estos cambios ambientales requieren repuestas específicas y rápidas en algunas vías moleculares asociadas a las respuestas de aclimatación. Los peces, como organismos ectotérmicos, están sujetos a los cambios ambientales en el medio marino. Esto tiene un impacto a diferentes niveles en los organismos, desde el molecular, fisiológico y de comportamiento (Richards, 2011). La modulación de la expresión génica es una de las primeras respuestas a los cambios en las condiciones ambientales que los peces pueden experimentar (Tine, 2017).

Los estudios que analizan el efecto de la temperatura en la respuesta molecular de los organismos marinos se han enfocado en la expresión de las proteínas de choque térmico (HSPs) (Tomanek, 2010). Estas proteínas actúan como chaperonas y contribuyen a la estabilización de polipéptidos desnaturalizados y proteínas nacientes, ayudando a su plegamiento adecuado y previniendo su agregación. Las HSPs se consideran un grupo conservado que se expresa de manera constitutiva e inducida y se han clasificado en algunas familias según su peso molecular en kDa (pequeñas hsps, hsp 10, 40, 60, 70, 90 y 100), siendo la HSP 70 una de las más estudiadas debido a que es la más conservada y se ha encontrado en una gran variedad de organismos (Madeira *et al.*, 2012; Yamashita *et al.*, 2010).

El factor inducible por hipoxia 1α (HIF- 1α) es un regulador involucrado en la homeostasis celular cuya expresión se ve inducida en peces expuestos a hipoxia ambiental (Tiedke *et al.*, 2014). El HIF- 1α regula diversos genes involucrados en tres vías principales, el desarrollo vascular, la producción de células sanguíneas y el metabolismo energético. Bajo condiciones normóxicas, HIF- 1α se sintetiza de manera constante, pero se degrada casi inmediatamente a través de la ruta ubiquitina-proteosoma. Sin embargo, en condiciones hipóxicas HIF- 1α forma un complejo estable con su subunidad β ; posteriormente, se trasloca

al núcleo y contribuye a modular la expresión de genes con una diversidad de roles (Xiao, 2015). Por lo tanto, HIF-1 α es considerado uno de los moduladores de la respuesta molecular y un indicador de bajas concentraciones de oxígeno (Smith *et al.*, 2012).

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) se forman naturalmente durante el metabolismo oxidativo. Una alteración en la producción de ERO puede ocurrir como resultado de la exposición a cambios ambientales, tales como la variación en la temperatura, oxígeno disuelto, salinidad, disponibilidad de alimento o la presencia de contaminantes en el ambiente (Alves de Almeida *et al.*, 2007). Si esta alteración no es balanceada por el sistema antioxidante, puede desencadenar daño celular y estrés oxidativo (Sies, 1985). Algunas enzimas antioxidantes, entre ellas, catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) contribuyen a la protección contra el daño oxidativo eliminando o transformando a las ERO a moléculas menos reactivas, aun cuando los organismos son expuestos a cambios ambientales (Eissa *et al.*, 2017).

Las SOD son una familia de metaloenzimas que catalizan la dismutación del radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2). SOD es una de las primeras líneas de defensa enzimática antioxidante contra las ERO. Actualmente se reconocen tres isoformas de SOD en vertebrados, dos de las cuales contienen cobre y zinc en su centro catalítico localizándose en el citoplasma y extracelularmente (Cu,Zn-SOD y EC-SOD), respectivamente, y una tercera que contiene manganeso como cofactor (Mn-SOD), localizada en la mitocondria (Olsvik *et al.*, 2005; Zelko *et al.*, 2002). El H_2O_2 es subsecuentemente reducido a H_2O y O_2 por reacciones catalizadas por CAT o glutatión peroxidasa (GPx), otras enzimas antioxidantes ampliamente distribuidas en los organismos. A nivel celular, CAT se localiza principalmente en peroxisomas y citosol, y se encuentra ausente en la mitocondria, donde la reducción del H_2O_2 es llevada a cabo por GPx (Ighodaro y Akinloye, 2017; Patnaik *et al.*, 2013; Yousuf *et al.*, 2012).

Los organismos comúnmente exhiben adaptaciones, así como la capacidad para alterar su fenotipo, dentro de sus límites fisiológicos en respuesta a los cambios ambientales (Somero, 2002). Algunos de los mecanismos subyacentes a estas adaptaciones, tanto fisiológicas como de comportamiento, están relacionados a los ciclos ambientales diarios.

Los ritmos circadianos son ritmos biológicos con una duración cercana a 24 h y que persisten inclusive en ausencia de estímulos externos. Estos patrones circadianos involucran, además, oscilaciones en la expresión génica a modo de regulación de diversos procesos fisiológicos (Podrabsky, 2004). Los ritmos circadianos tienen importancia adaptativa, ya que permiten establecer una concordancia entre los sucesos del ambiente y la organización de las funciones biológicas, permitiendo que los organismos se preparen para responder a condiciones ambientales predecibles (Vera *et al.*, 2013).

Se han caracterizado y analizado genes involucrados en mantener el ritmo circadiano; a este grupo se le conoce como genes circadianos o “clock genes”. El mecanismo molecular del reloj circadiano involucra la interacción de señales, tanto positivas como negativas, que participan en la regulación de la transcripción rítmica de los genes circadianos. La expresión de éstos es regulada por dos mecanismos de activación y represión transcripcional. El mecanismo de retroalimentación positiva lo controlan los genes clock (circadian locomotor output cycles kaput) y *bmal1* (brain and muscle ARNt-like protein-1), mientras que la retroalimentación negativa es controlada por los genes *period* (*per*) y *criptocromo* (*cry*) (Koch *et al.*, 2017). El factor de transcripción BMAL1 forma un dímero con CLOCK para activar los genes *per1* y *2* y los genes *cry1* y *2*. Esto lo logran uniéndose a secuencias reguladoras (cajas E) localizadas en los promotores de *per* y *cry* para activar su transcripción. Ya como proteínas, PER y CRY se asocian formando heterodímeros que son traslocados al núcleo, acumulándose. Los heterodímeros PER:CRY interfieren con la unión de CLOCK:BMAL1 en el sitio promotor de los genes *per* y *cry*, inhibiendo así su propia transcripción (Amaral y Johnston, 2012; Buhr y Takahashi, 2013).

Los perfiles de expresión génica se han convertido en una herramienta en fisiología; se consideran una respuesta rápida de los organismos ante cambios ambientales y los niveles de ARNm representan una “fotografía instantánea” de las condiciones celulares en un momento dado. Los cambios en la expresión de genes podrían aparecer en una etapa inicial, después de la exposición a cambios en alguno(s) de los factores abióticos, desencadenando así señales subsecuentes, como la expresión de proteínas o cambios en la actividad de estas proteínas, dependiendo de la intensidad del estímulo (Woo *et al.*, 2013). Los cambios en la

expresión de genes han permitido ampliar el panorama de los mecanismos moleculares, celulares e incluso fisiológicos, que forman parte de la respuesta adaptativa de los organismos ante la variabilidad ambiental (Evans y Hofmann, 2012).

El presente estudio tiene como objetivo analizar si la variabilidad de los factores abióticos (temperatura, oxígeno disuelto y salinidad) y bióticos (ritmo circadiano) afecta la expresión de genes de respuesta asociados a fluctuaciones ambientales y al propio ritmo circadiano en peces crípticos arrecifales. El gobio cabeza roja *Lythrypnus dalli* (Gilbert 1890) es una especie cuyas características lo hacen un buen modelo para conocer la respuesta fisiológica ante las condiciones fluctuantes de su ambiente. Para ello, se propuso cuantificar la expresión de los genes asociados a temperatura (*hsp70*), hipoxia (*hif1 α*), estrés oxidativo (*mn-sod*) y al ciclo circadiano (*clock*, *cry1* y *per2*) en peces crípticos arrecifales de la especie *L. dalli* a lo largo de un día, tanto durante la temporada cálida como durante la temporada fría, para contrastar las respuestas a condiciones ambientales extremas.

2. ANTECEDENTES

Los peces son sensibles a la variabilidad en la temperatura en una base estacional y diaria. Cómo responden estos organismos a condiciones constantes o fluctuantes en el ambiente natural, es una pregunta que aún falta por ser analizada (Logan y Buckley, 2015).

2.1 Generalidades de los eventos ambientales en sistemas arrecifales

Los sistemas arrecifales son uno de los ecosistemas más productivos y diversos que existen. En ellos, los factores abióticos varían en escalas espaciales y temporales independientes. Al estar cerca de la costa, éstos están sujetos a la influencia de las condiciones presentes, tanto en el ambiente marino como el terrestre. En la gran barrera arrecifal australiana, uno de los sistemas arrecifales mejor conocidos, se han reportado cambios diarios en la turbidez, temperatura, movimiento de la marea y la acción de las olas (Wenger *et al.*, 2016). Los autores reportan un cambio estacional gradual de 10 °C (20 a 30 °C) a lo largo de cuatro meses (abril-agosto), siendo la temperatura el principal factor que estimula el crecimiento en peces arrecifales. Esta variación es muy similar a lo reportado en la región sur del Golfo de California, en especial en la Bahía de La Paz, Baja California Sur, donde la temperatura alcanza los 30 °C durante el verano, para disminuir gradualmente a 20°C en invierno (Reyes-Salinas *et al.*, 2003). El tiempo y la intensidad de cada factor abiótico influirán en gran medida en la respuesta de los organismos que ahí habitan.

El oxígeno disuelto también es un factor que fluctúa constantemente en los sistemas arrecifales. En la plataforma arrecifal rocosa de la Isla Tallon, Australia, se han reportado variaciones en la temperatura del agua y la concentración de oxígeno disuelto de hasta ~11°C y ~14 mg L⁻¹, respectivamente (Gruber *et al.*, 2017). Los autores reportan que esta variación obedece principalmente a la fuerte influencia que tiene la marea sobre esta área, lo que genera un flujo constante en el nivel del agua y, por lo tanto, en los factores abióticos. En el arrecife coralino en la bahía de Kane‘ohe, Hawaii, se evidencía la variación temporal de algunos parámetros ambientales (Guadayol *et al.*, 2014). La variación de la temperatura reportada fue de 6°C, y para el pH de 0.19. Además, mencionan que las perturbaciones que son demasiado cortas o poco frecuentes pueden no desencadenar una respuesta en los organismos o no tener

un efecto duradero; pero, a través de la aclimatación, la variabilidad natural a largo plazo puede aumentar la tolerancia a eventos ambientales como el cambio climático (Guadayol *et al.*, 2014). Por lo anterior, los arrecifes tropicales son apropiados para la investigación de fluctuaciones temporales en los factores abióticos y sus efectos en los organismos.

2.2 Generalidades de *Lythrypnus dalli*

El gobio cabeza roja *L. dalli* (Gilbert 1890), es un pez críptico perteneciente a la familia Gobidae, una de las más grandes y diversas entre los peces óseos (Fig. 1). Esta familia se compone de peces de tamaño pequeño, cuya flexibilidad fisiológica y ecológica les ha permitido explotar un gran número de hábitats, algunos extremos (Allen y Robertson, 1994; Thomson *et al.*, 2000). A pesar de su amplia distribución, los gobios están mejor representados en el hábitat marino y en su mayoría se encuentran en áreas tropicales y subtropicales. Son un importante componente en términos de biodiversidad; sin embargo, algunos gobios son poco llamativos, ya sea por su reducido tamaño o por su ecología, algunas especies son crípticas y se ocultan en grietas o intersticios en la arena, arrecifes o sustratos rocosos (Tavera y Rojas-Vélez, 2017; Thacker, 2011). Estas características provocan que algunas especies sean poco conocidas y con frecuencia se identifican erróneamente (Thacker y Roje, 2011).



Figura 1. *Lythrypnus dalli* (Gilbert 1890) (Tomado de <http://blog.reefstudio.es>).

El gobio cabeza roja (*L. dalli* Gilbert, 1890) se caracteriza por su color rojo o anaranjado brillante y presenta un par de barras azules angosta en la cabeza, y de 3 a 5 barras similares en el cuerpo. Tiene un cuerpo robusto cubierto de pequeñas escamas ctenoideas y la cabeza redondeada. Las aletas pélvicas están completamente unidas, mientras que las 3-4 primeras

aletas dorsales son prolongadas, en los machos son filamentosas (Allen y Robertson 1994; Thomson *et al.*, 2000). Es una especie de tamaño relativamente pequeño, alcanzando hasta los 6.4 cm (Robertson y Allen, 2015).

Los estudios acerca de *L. dalli* son escasos y, en general, se limitan a reportar datos ecológicos. Su distribución se extiende desde las costas de California, E.U.A. hasta Panamá, incluyendo el Golfo de California y las islas del Coco, Malpelo y Galápagos. Se encuentra en aguas someras hasta los 75 m de profundidad y tiene preferencia por las superficies submareales rocosas cubiertas de algas u organismos incrustados (Robertson y Allen, 2015; Thomson *et al.*, 2000). Esta especie se alimenta principalmente de plancton y pequeños crustáceos bentónicos, como copépodos, ostrácodos y anfípodos (Archambeault *et al.*, 2016). De vida relativamente corta, se reproduce en la primavera y verano de su primer año de vida, y sólo algunos individuos llegan al segundo año. *L. dalli* es una especie hermafrodita simultánea y establece jerarquías de dominancia basada en el tamaño, donde un macho dominante defiende el nido junto con múltiples hembras (Behrents, 1987). Los huevos generalmente son depositados en conchas y restos de gusanos tubícolas. Los machos suelen exhibir un comportamiento de cortejo y se encargan del cuidado parental (Lorenzi *et al.*, 2006).

2.3 Respuesta molecular de peces a condiciones ambientales

2.3.1 Mecanismo molecular del ciclo circadiano en peces.

En los seres vivos, muchas funciones biológicas dependen de la sincronización de los ritmos biológicos endógenos y los estímulos ambientales. Los ciclos de luz/oscuridad, alimentación y temperatura son de los principales estímulos que sincronizan los ritmos circadianos (Buhr y Takahashi, 2013). En vertebrados, el mecanismo molecular responsable de la modulación circadiana implica la retroalimentación transcripcional-traducciona conjunta de los genes y proteínas “reloj” (Andreani *et al.*, 2015). Varios estudios evidencian que las señales externas antes mencionadas pueden modular la expresión de algunos de estos genes reloj o circadianos (clock genes), generando una ritmicidad en las respuestas conductuales y fisiológicas diurnas.

La expresión de los genes circadianos en cerebro de la dorada (*Sparus aurata*) está acoplada al ciclo diurno de alimentación (Vera *et al.*, 2013). La expresión de los genes *bmal1* y *clock* aumenta durante la transición día/noche, mientras que la expresión de *per2* y *cry1* es mayor al inicio de la fase de luz, sugiriendo un desfase entre los mecanismos de retroalimentación (Vera *et al.*, 2013). Por otra parte, Amaral y Johnston (2012) identificaron patrones circadianos en la expresión de estos mismos genes en músculo de pez zebra (*Danio rerio*), reportando un pico en la expresión de *bmal1* y *clock* 12 h después de la exposición a luz, y un pico en la expresión de *cry1a*, *per1a/1b*, *per2*, *per3* y *nrd1* al inicio de la exposición a luz. En ambos estudios (Amaral y Johnston, 2012; Vera *et al.*, 2013) se sugiere que el mecanismo circadiano desempeña un papel fisiológico en la regulación de la homeostasis de la masa muscular.

Los estudios transcriptómicos de Boyle *et al.* (2017) y Yúfera *et al.* (2017) sugieren patrones similares de expresión en los genes circadianos en peces; aparentemente los genes *per1*, *2* y *3*, *cry1* y *2* alcanzan su punto máximo de expresión al amanecer y los del *bmal1*, *reloj* y *nfil3* al atardecer. Estos autores concluyen que el mecanismo circadiano, regulado por los genes reloj, juega un papel clave en la organización diaria del transcriptoma al modular la expresión de otros genes involucrados en distintos procesos celulares. La expresión génica también varía cuando los organismos son sometidos a cambios en los estímulos externos. Por ejemplo, la expresión de los genes circadianos en cerebro del pez cebra (*D. rerio*), se regula en respuesta a la exposición continua de luz u oscuridad (Purushothaman *et al.*, 2015). Algunos genes dejan de seguir el patrón normal de expresión ante tales condiciones y sólo se expresaron ante luz continua (*clock*, *per1a*, *per1b*, *bmal2*, *cry3*); mientras que otros sólo lo hicieron ante oscuridad (*per1a*, *per1b*, *per2*, *per3*, *cry1b*), sin seguir un patrón rítmico (Purushothaman *et al.*, 2015).

La información sobre la variación diurna en la expresión génica de las enzimas antioxidantes en vertebrados es escasa. Los niveles de expresión génica de las defensas antioxidantes pueden verse afectados por los ritmos circadianos en hígado de ratones (Xu *et al.*, 2012). Los niveles de expresión de *cat* por estos autores varían a lo largo del día, con un pico a las 14:00 horas, mientras que los niveles de expresión de *sod* y de la hemo oxigenasa

1 (ho-1) fluctuaron levemente a lo largo del día, con ligeros cambios en la fase de luz (Xu *et al.*, 2012). Se sugiere que los ritmos circadianos no sólo pueden regular el estado redox del cuerpo, sino también la transcripción de genes sensibles al estado redox.

2.3.2 Respuesta molecular a variaciones en parámetros ambientales en peces.

La variación ambiental diurna involucra más que cambios de luz, particularmente en sistemas arrecifales someros donde algunos factores ambientales aumentan y disminuyen a lo largo del día (Sundararajan *et al.*, 2018). Se han reportado una gran cantidad de genes que se activan por cambios en estos factores, particularmente ante los cambios térmicos y en la disponibilidad de oxígeno disuelto. Algunos de estos genes participan en distintos procesos biológicos como la regulación transcripcional, transducción de señales, crecimiento celular, regulación del metabolismo y respuesta al estrés (Buckley *et al.*, 2006; Nikinmaa y Rees, 2005).

Algunos de los genes más estudiados como respuesta a fluctuaciones térmicas son las proteínas de choque térmico (HSPs). Particularmente, la familia de las Hsp70 (68–73 kDa) representa una respuesta rápida y altamente conservada a través de los diversos taxa, desde bacterias hasta vertebrados (Feder y Hofmann, 1999; Jong *et al.*, 2008). Por ello, hsp70 se ha propuesto como marcador para la detección temprana de cambios ambientales y riesgos ecológicos en la biota acuática. En peces se han reportado distintos patrones de expresión, por ejemplo, en el gobio *Gillichthys mirabilis* se reporta la inducción inmediata en la expresión de hsp70 y hsp90 ante un aumento en la temperatura de 28 a 34°C (Long *et al.*, 2012). En músculo del barramundi *Lates calcarifer* se observó la inducción de hsp70 durante los primeros 30 min de incremento de temperatura (28 a 36 °C) (Newton *et al.*, 2012). En la platija *Paralichthys olivaceus* un aumento gradual de la temperatura (de 24 a 32°C) incrementó la expresión de hsp70 en la mayoría de los tejidos (Yifan *et al.*, 2015). En dos poblaciones del pez eurihalino (*Fundulus heteroclitus*) los niveles de la expresión de hsp70-1 incrementaron gradualmente a 33, 34 y 35 °C respecto a los niveles control (20 °C); mientras que la expresión de hsp70-2 también incrementó a 33 °C, aunque la magnitud fue diferente entre poblaciones (Fangue *et al.*, 2006). Los estudios anteriores sugieren una

sobreexpresión del gen hsp70 ante incrementos en la temperatura, esto convierte al gen en un excelente candidato para el estudio de la fisiología térmica en peces.

La expresión génica de algunas enzimas antioxidantes también puede ser modulada por la temperatura. En células sanguíneas del pez globo (*Takifugu obscurus*), la expresión génica de las enzimas antioxidantes Cu,Zn-sod, Mn-sod, cat, gpx y gr y de las proteínas de choque térmico hsp90 y hsp70 aumentó con el incremento de la temperatura (de 25 a 34 °C); los autores concluyen que el potencial estrés oxidativo consiguiente puede causar apoptosis en las células (Cheng *et al.*, 2015). La expresión de los genes Cu,Zn-sod, Mn-sod, gpx y gr, disminuyó en hígado de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) expuestos a una mayor temperatura (19 °C) en comparación con el óptimo para esta especie (13 °C); no se identificaron diferencias en la expresión de cat (Olsvik *et al.*, 2013). El ciprínido de agua dulce *Onychostoma macrolepis* mostró un aumento significativo en la expresión de los genes Cu,Zn-sod y cat en varios tejidos, ante un aumento en la temperatura de 24 a 30 °C (Yu *et al.*, 2017). Los resultados de estos estudios sugieren que la respuesta al estrés oxidativo es un mecanismo fuertemente afectado en organismos expuestos a cambios térmicos; por ello, la respuesta antioxidante relevante en la tolerancia térmica.

La disponibilidad de oxígeno en el medio es un factor crucial para los animales acuáticos. Sin embargo, la tasa de difusión de este elemento en el agua es 10 veces mayor en el agua. Esto provoca que el consumo de oxígeno por procesos biológicos, propicie cambios en su disponibilidad (Rytkönen *et al.*, 2007). Adicionalmente, la temperatura también puede ejercer un efecto sobre la disponibilidad del oxígeno, ya que un aumento en la temperatura reduce la cantidad de oxígeno disuelto en el agua (Nikinmaa y Rees, 2005). Si bien, las concentraciones de oxígeno en el medio marino son altamente fluctuantes, el fenómeno más estudiado al respecto ha sido el de hipoxia, ya sea aguda o crónica. Esta condición puede afectar los niveles de expresión de distintos genes, principalmente de hif-1 α , un factor de transcripción que actúa como un regulador central de la respuesta a hipoxia.

En cerebro e hígado de la perca de río (*Perca fluviatilis*) después de un tratamiento hipóxico agudo (0.4 ± 0.1 mg L⁻¹ de O₂ disuelto por 1 h) se observó sobreexpresión de hif-1 α , mientras que después de un tratamiento crónico (2.8 ± 0.3 mg L⁻¹ de O₂ disuelto por 15

días) los niveles de expresión de hif-1 α fueron mayores únicamente en músculo respecto a las condiciones control de $9.0 \pm 0.3 \text{ mg L}^{-1}$ de O₂ disuelto (Rimoldi *et al.*, 2012). En hígado del pez dragoncito (*Callionymus valenciennei*) colectado en sitios hipóxicos (1.7 mg L^{-1} de O₂ disuelto) se observaron mayores niveles de expresión de hif-1 α que en los peces provenientes de sitios no hipóxicos (2.9 mg L^{-1} de O₂ disuelto); además, bajo condiciones de laboratorio los niveles se incrementaron después de 7 días de exposición a hipoxia ($1.4\text{-}1.5 \text{ mg L}^{-1}$ de O₂ disuelto), disminuyendo al regresar a condiciones normóxicas (4.3 mg L^{-1} de O₂ disuelto) (Kodama *et al.*, 2012). En cerebro, branquias y corazón de la platija *Platichthys flesus* expuesta a hipoxia severa (1.5 mg L^{-1} de O₂ disuelto) en condiciones de laboratorio se observó un aumento en los niveles de hif-1 α ; los niveles del mismo gen fueron ligeramente mayores en las branquias de la acerina (*Gymnocephalus cernua*) en condiciones de campo, mas no en la platija (*P. flesus*) (Tiedke *et al.*, 2015). En condiciones de laboratorio y como resultado de exposición a hipoxia aguda (2 mg L^{-1} O₂ disuelto), se observó un incremento en los niveles de expresión de hif-1 α en hígado del arenque del Pacífico (*Clupea pallasii*); estos valores se redujeron al regresar los peces a condiciones normóxicas (Froehlich *et al.*, 2015). En hígado del bagre *Pelteobagrus vachelli*, la expresión de Cu,Zn-sod y Mn-sod y la actividad de las enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx, GR y GST) aumentaron ante condiciones hipóxicas; particularmente, la expresión de la Mn-sod aumentó ante una disminución de la concentración de O₂ disuelto de 6.8 a 0.7 mg L^{-1} por 1.5 h; al ser nuevamente expuesto a condiciones normóxicas la expresión génica de Mn-sod disminuyó (Zhang *et al.*, 2016).

3. JUSTIFICACIÓN

En el medio marino, los organismos se enfrentan a múltiples cambios abióticos simultáneamente. Estos cambios requieren respuestas de aclimatación rápidas y específicas. A nivel molecular, estas respuestas se ven facilitadas, a su vez, por la inducción de la expresión génica como una de las primeras respuestas de los organismos. El cambio climático podría tener un impacto significativo sobre las estrategias de supervivencia en organismos marinos. En este sentido, las respuestas adaptativas de los organismos a sus condiciones ambientales actuales pueden proporcionar pistas importantes sobre cómo podrían enfrentar cambios ambientales futuros. Una gran cantidad de estudios que analizan la respuesta molecular a condiciones ambientales fluctuantes se han realizado bajo condiciones controladas de laboratorio. Sin embargo, en el ambiente natural esta respuesta es afectada por la acción sinérgica de diferentes parámetros ambientales y es menos conocida. Por lo anterior, es importante ampliar el conocimiento sobre la expresión y regulación de los genes relacionados con la condición física individual, con el fin de comprender mejor los procesos adaptativos de las poblaciones silvestres. Los peces, en particular los peces arrecifales, son un potencial modelo de estudio de dichas respuestas, por ser organismos cuya fisiología está estrechamente ligada al ambiente. Comprender cómo los factores abióticos influyen en los peces arrecifales en condiciones naturales es importante para conocer los riesgos que enfrentan como recursos marinos.

4. HIPÓTESIS

Si los factores ambientales no cambian durante el ciclo circadiano, pero fluctúan entre temporadas, entonces la expresión diferencial de genes estará asociada a los factores ambientales y no a la respuesta endógena del organismo.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar el efecto de la variación ambiental diurna y estacional sobre la expresión génica en el pez críptico *L. dalli* en Punta Diablo, La Paz, Baja California Sur.

5.2 Objetivos particulares

- Determinar el efecto del ciclo circadiano en la temporada cálida y fría (verano – invierno) en el pez críptico *L. dalli*, sobre los niveles de expresión de genes seleccionados (*hsp70*, *hif1 α* , *mn-sod*, *clock*, *cry1* y *per2*) por qPCR.
- Determinar el efecto de las variaciones ambientales naturales entre la temporada cálida y fría (verano – invierno) en el pez críptico *L. dalli*, sobre los niveles de expresión de genes seleccionados (*hsp70*, *hif1 α* , *Mn-sod*, *clock*, *cry1* y *per2*) mediante qPCR.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Área de estudio

Los muestreos se llevaron a cabo en Punta Diablo, al sureste de la Bahía de La Paz (24° 18' 45" N y 110° 20' 13" O) (Fig. 2). Este sitio es una caleta semiprotegida de los vientos que se presentan en la Bahía durante otoño e invierno (Zayas-Álvarez, 2005). El área no tiene playa cercana y se compone de sustrato irregular, principalmente rocoso. Punta Diablo tiene una pendiente pronunciada que alcanza 10 m de profundidad a una distancia aproximada de 15 m de la costa; a partir de ahí, el sustrato se vuelve plano y arenoso. Predomina el hábitat arrecifal de tipo rocoso (paredes y algunas rocas grandes), con oquedades o agujeros que proporcionan refugio a un gran número de organismos. En la zona somera (primeros 3 m de profundidad) se observa una angosta planicie compuesta por parches y cabezas aisladas de coral *Pocillopora* spp. (Calderón-Parra, 2009).



Figura 2. Área de estudio, Punta Diablo (24° 18' 45" N y 110° 20' 13" O), Bahía de La Paz, Baja California Sur.

6.2 Colecta de organismos

Se realizaron dos muestreos, uno durante la temporada cálida (octubre 2017) y otro durante la temporada fría (abril 2018), con el fin de obtener la mayor amplitud posible en los factores ambientales. La toma de muestras se llevó a cabo mediante buceo SCUBA. En ambos muestreos, la primera inmersión se llevó a cabo a las 12:00 h seguida de otra cada 4 h hasta cumplir con un ciclo diurno (24 horas). La profundidad de los buceos fue de 10 m, con una duración aproximada de 20 min cada uno.

Se tomaron medidas *in situ* de los factores ambientales cada hora y durante todo el periodo de muestreo. Los datos de temperatura (°C), oxígeno disuelto (mg L^{-1}) y salinidad (ppm) fueron obtenidos mediante un medidor multiparámetros YSI Pro2030 (Pro2030, OH, E.U.A). Estas mediciones se realizaron desde superficie y lo más cercano posible al sitio de muestreo, dejando caer el sensor hasta los 10 m de profundidad.

La colecta de los individuos de *L. dalli* se realizó sobre el área de pared rocosa. Para ello, se eligió un punto sobre la pared en el que se identificaron oquedades o grietas. Sobre estas hendiduras se esparció una mezcla de esencia de clavo y etanol (1:3) con el fin de adormecer a los organismos y facilitar su captura mediante redes manuales. Una vez en superficie, los organismos fueron colocados en bolsas debidamente etiquetadas y fijados inmediatamente en nitrógeno líquido. Posteriormente, las muestras fueron transportadas al Laboratorio de Genética Molecular de CIBNOR donde se mantuvieron en congelación (-80°C) hasta su análisis.

6.3 Trabajo en laboratorio

6.3.1 Extracción de ácido ribonucleico (ARN)

El ARN total fue extraído utilizando el método de solución desnaturante tiocianato de guanidina acetato de sodio-fenol-cloroformo (AGCP) con reactivos preparados en el laboratorio. Todas las soluciones se trataron con dietil pirocarbonato (DEPC) al 0.1%

para lograr un entorno libre de ARNasas. Las muestras se mantuvieron en hielo para evitar la degradación del ARN.

Dado el tamaño de los peces (<5 cm), para la extracción de ARN se utilizaron individuos completos. A las muestras de 50 a 100 mg se les agregó 500 μ L de solución AGCP y se homogenizó con pistilo por 1 min. Se agregaron 50 μ L de acetato de sodio 2 M, 500 μ L de fenol saturado en agua DEPC y 150 μ L de cloroformo, mezclando por inversión. Se centrifugó a 11300 x g por 10 min a temperatura ambiente y se recuperaron aproximadamente 500 μ L de la fase acuosa. El ARN se precipitó con 700 μ L de isopropanol absoluto durante 30 min en refrigeración a -20 °C. Para recuperar el ARN, se centrifugó nuevamente a 11300 x g durante 20 min a 4 °C, descartando el sobrenadante. Se realizó una segunda extracción, resuspendiendo el material precipitado de ARN (pellet) en 500 μ L de solución AGCP. Posteriormente, se realizaron dos lavados por inversión del precipitado de ARN con 500 μ L de etanol al 75% en agua DEPC, previamente enfriado, centrifugando a 11300 g durante 20 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el pellet se dejó secar a temperatura ambiente; finalmente, se resuspendió en 20 μ L de agua DEPC para la posterior cuantificación del ARN.

6.3.2 Cuantificación y análisis de integridad del ácido ribonucleico (ARN)

Para determinar la cantidad y calidad del ARN extraído, las muestras se midieron en un espectrofotómetro (NanoDrop ND-2000[®], Thermo Scientific) utilizando el coeficiente de la relación entre las lecturas a las absorbancias de 260 y 280 nm. Se consideraron como ARN de buena calidad aquellas muestras con un coeficiente entre 1.8 y 2.1, lo que significa que el ARN no está contaminado; el factor de conversión utilizado fue de 40 μ g mL⁻¹.

El análisis de integridad y pureza del ARN extraído se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa/Synergel[®] al 1% en buffer TBE-DEPC (Tris, ácido bórico, EDTA). Para corroborar la ausencia de ADN genómico se llevó a cabo una reacción en cadena de polimerasa (PCR), utilizando 1 μ L de muestra (50 ng de ARN) como templado en una reacción con oligonucleótidos específicos del gen 16s. Como control positivo se utilizó ADN de *L. dalli*, y agua como control negativo. Los productos de la amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa/Synergel[®] al 1% en buffer TBE 1X.

Cada electroforesis se llevó a cabo en cámaras horizontales (Biorad) a 80V por 40 min. Los geles se documentaron con un fotodocumentador (Chemidoc[®], Biorad).

6.3.3 Síntesis de ADN de doble cadena complementario (ADNc)

Se realizó una transcripción inversa a partir del ARN total para obtener el ADN de doble cadena complementario (ADNc). Para ello, en un tubo eppendorf de 0.5 mL, se colocaron 4 µL de Buffer Improm-II 5x (A3803, Promega), 5 µL de agua destilada esterilizada, 2.5 µL de MgCl₂ (25mM), 1 µL de dNTPs (10mM), 0.5 µL de RNAsina, 1 µL de oligo-dT18 (10mM), 1 µL de Improm-II RT (Promega) y finalmente 1 µL de ARN (1 µg) para un volumen final de 5 µL. La mezcla de reacción se colocó en un termociclador (Biorad T100[®] Thermal Cycler) con un programa de 5 min a 25 °C, 60 min a 42 °C y 15 min a 72 °C. La mezcla de reacción se almacenó a -20 °C hasta su posterior análisis.

6.3.4 Diseño de oligonucleótidos para PCR punto final

Para amplificar los genes fue necesario diseñar oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes blanco (Tabla I). Estos fueron diseñados a partir del alineamiento de secuencias homólogas de peces filogenéticamente cercanos, mismas que se encontraron en la base de datos de NCBI GenBank (Anexo 3). El análisis de alineamiento para seleccionar las regiones homólogas se realizó mediante el programa MEGA7[®] (Kumar *et al.*, 2016). Una vez alineadas, las secuencias fueron ensambladas generando una secuencia consenso mediante el programa DNA Baser v4.36.0 (Heracle Biosoft, 2013). A partir de la secuencia consenso se diseñaron los oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes de interés utilizando la herramienta informática Primer3 v.0.4.0 (Untergasser *et al.*, 2012).

Tabla I. Genes de interés y resumen de su función.

Genes	Función
hsp70 (Proteína de choque térmico 70)	La proteína de choque térmico 70 es una chaperona molecular involucrada en la estabilización de polipéptidos desnaturalizados, mediando su plegamiento y agregación (Tomanek, 2010).
hif-1α (Factor inducible a hipoxia 1 α)	Activa la vía de señalización ante condiciones hipóxicas (Xiao, 2015).
Mn-sod (Superóxido dismutasa)	Enzima antioxidante, considerada una de las primeras líneas de defensa ante los radicales libres. Su función es dismutar el O ₂ ⁻ en H ₂ O ₂ (Zhang <i>et al.</i> , 2016).
clock (por sus siglas en inglés “Circadian locomotor output cycles kaput”)	Este gen codifica una proteína implicada en la regulación de los ritmos circadianos. Forma un dímero con bmal para activar los genes <i>per</i> y <i>cry</i> (Buhr y Takahashi, 2013).
cry 1 (Criptocromo 1)	Expresión en respuesta a la luz. Componente del complejo circadiano. Participa en la inhibición del CLOCK/BMAL, regulando así su propia transcripción (Buhr y Takahashi, 2013).
per2 (Periodo 2)	Proteína clave en el mecanismo del reloj biológico. Junto con CRY, inhibe el sistema CLOCK/BMAL (Wang, 2008).

Las condiciones que se establecieron en Primer3 para el diseño de los oligonucleótidos fueron un tamaño de 18-21 pb; una temperatura de fusión (T_m) de 55 a 60 °C, y un porcentaje de guaninas-citocinas (% GC) de 55 %. Las características de cada uno de los oligonucleótidos (número de bases, T_m y % GC) fueron corroboradas por el programa OligoAnalyzer 3.1 (Owczarzy *et al.*, 2008). También se evaluó el criterio de autocomplementariedad, con el objetivo de evitar la formación de estructuras secundarias o la dimerización de los oligonucleótidos mediante el programa OligoCalc: Oligonucleotide Properties Calculator (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>).

Tabla II. Oligonucleótidos diseñados a partir de secuencias homólogas reportadas en GenBank (NCBI).

		secuencia 5'-3'	T _m	Tamaño amplicón (pb)	% GC
hsp70	F	GAGAACGTGCAGGACCTGCT	67.3	155	50
	R	CCGGGCTGGTTGTCGAAGTA	69.6		50
hif 1α	F	AGCTCCAGCCTGGACAAGGC	70.4	150	65
	R	GCCCTCCAAAGCCTTCAGGT	69		60
Mn-sod	F	CAGCAAGCACCACGCCACTT	71.1	180	60
	R	GTGGTTAATGTGGCCTCCTCC	66.9		57
clock	F	AAAGAGCTGGGCACCATGCT	68.5	145	50
	R	GAGGCTTCCAGTCCTGTCTGA	66.2		57
cry 1	F	CTCACCGACCTCTACCGCAA	67.9	150	60
	R	ACACAGATGGGGTTTCCCTCC	68.6		59
per2	F	CTCCTACCAGCAGATCAGCTG	64.4	140	57.1
	R	TTGTCCTCATCAGAGTTGGAGGA	67.4		47.8
β-actin	F	TGAAGATCCTGACAGAGCGTGCC	72.1	180	56.5
	R	TTGCCGATGGTGATGACCTGT	70.2		52.4

T_m = temperatura de fusión; pb = pares de bases; % GC = porcentaje de guaninas citocinas.

6.3.5 Optimización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final para los genes de interés.

Para la amplificación de las regiones específicas de los genes enlistados anteriormente (Tabla II), se utilizó como templado el ADNc sintetizado a partir del ARN de *L. dalli*. La reacción de PCR fue llevada a cabo en un volumen final de 12.5 μ L conteniendo 1 μ L de ADNc (50 ng μ L⁻¹), 1 μ L de cada uno de los oligonucleótidos 5 μ M (sentido y antisentido), 6.25 μ L de GoTaq[®] polimerasa 2x (Promega) y 3.25 μ L de agua estéril Milli-Q[®]. La PCR se llevó a cabo de acuerdo a las siguientes condiciones de amplificación; desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min (1 ciclo); desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineamiento a 50-60 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 1 min (40 ciclos); una extensión final de 72 °C por 10 min (1 ciclo) y 4 °C por el tiempo restante. Los productos de amplificación obtenidos se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa/Synergel[®] al 1% en buffer TBE 1X.

En cada pozo del gel se cargaron 6 μL de cada producto y 1 μL de Uview[®] (Biorad); además, se colocó en cada gel un carril con marcador de 1 Kb (Invitrogen). Cada electroforesis se llevó a cabo en cámaras horizontales (Biorad) a 80 V por 40 min. Los geles se documentaron con un fotodocumentador (Chemidoc[®], Biorad). Los productos obtenidos fueron enviados a secuenciar a la empresa Macrogen en Korea (www.macrogen.com).

6.3.6 Análisis de la expresión cuantitativa de los genes de respuesta mediante PCR en tiempo real (qPCR)

La cuantificación de los niveles de expresión de los genes de interés se llevó a cabo siguiendo la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR). Esta técnica presenta la ventaja de amplificar y cuantificar al mismo tiempo las moléculas de ADNc; para lograrlo se utilizan fluoróforos capaces de unirse a las secuencias de interés. Los fluoróforos son marcadores que emiten una señal fluorescente proporcional a la cantidad de transcritos presentes, la cual es detectada y procesada en tiempo real (Arya *et al.*, 2005).

La eficiencia de la reacción de qPCR es un parámetro crucial en la determinación de la expresión de genes. La eficiencia se refiere a la capacidad de dicha reacción para duplicar el número de copias de las dobles cadenas de ADNc (Arunraj y Samuel, 2018). Para determinar la eficiencia de la qPCR, se construyeron curvas estándar para cada uno de los genes de interés y el de referencia, a partir de cinco diluciones seriadas (Tabla III). La amplificación de las curvas se realizó por triplicado para cada una de las diluciones utilizando ADNc como templado.

Tabla III. Concentración de las diluciones de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) para una curva estándar.

Dilución	Factor de dilución	Concentración ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$)		Templado (μL)	Vol. final de dilución (μL)
		Inicial	Final		
	0.2	50	2.5		
1:5	0.04	10	0.5	5	20
1:5	0.008	2	0.1	5	20
1:5	0.0016	0.04	0.002	5	20
1:5	0.00032	0.008	0.0004	5	25

A partir de las curvas de disociación se determinó si la amplificación de los genes mostró un producto único y específico visualizado como un solo pico. Posteriormente, se obtuvo la eficiencia de reacción de amplificación (E) para cada gen. Para ello, se graficó el \log_{10} de la concentración de cada dilución vs el ciclo de la PCR a partir del cual se detecta la fluorescencia (valor de Ct); la pendiente de la recta (m) obtenida se utilizó para calcular la eficiencia mediante la siguiente fórmula:

$$E = 10^{\frac{-1}{m}} \quad (1)$$

Para cada reacción se utilizaron los siguientes componentes: 1.5 μL de Buffer 10x, 0.75 μL de MgCl_2 (50 mM), 0.25 μL de dNTPS (10 mM), 0.7 μL de oligonucleótidos 5 μM (sentido y antisentido), 0.07 μL de Taq polimerasa recombinante (5 U μL^{-1}), 0.75 μL de Eva Green 20X (Biotium), 5 μL de ADNc (diluciones 1:5 partiendo de una concentración inicial de 50 ng μL^{-1}) y 5.8 μL de agua estéril miliQ en un volumen final de 15 μL . El control negativo se realizó por duplicado utilizando agua estéril miliQ. Las condiciones de amplificación fueron: 10 min a 95 °C; seguidos de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 15 s, de hibridación a 60 °C por 1 min y de extensión a 75 °C por 20 s. Por último, se realizó una curva de disociación de 65 °C a 95 °C con un incremento de temperatura de 0.5 °C cada 10 s. El análisis de las muestras se realizó por duplicado utilizando ADNc (dilución 1:10), y en cada corrida de amplificación se incluyó un control negativo por duplicado (sin templado, NTC).

6.4 Análisis de datos

6.4.1 Cuantificación relativa por el método de Pfaffl

Para la elección del método de cuantificación de la expresión génica se determinó si la eficiencia de reacción fue cercana a 100% y si los distintos genes tuvieron la misma pendiente. Bajo estos supuestos el método de cuantificación relativa elegido fue el propuesto por Pfaffl (2004). Este método permite obtener la magnitud de los cambios en los niveles de expresión de los genes de respuesta en comparación con el gen de referencia (β -actina). Los cálculos se basan en la comparación de los valores del ciclo cumbre (Ct) de las muestras,

utilizando la eficiencia de la reacción de qPCR como factor de corrección. La ecuación es la siguiente:

$$Tasa\ de\ expresión\ relativa = \frac{(E_{targ})^{\Delta Ct\ targ\ (control - muestra)}}{(E_{ref})^{\Delta Ct\ ref\ (control - muestra)}} \quad (2)$$

Donde E corresponde a la eficiencia, $targ$ es el gen de respuesta y ref es el gen de referencia. Debido a que no se trabajó con tratamientos experimentales, sino con organismos obtenidos durante distintas horas del día en dos temporadas, para realizar la normalización se tomó como condición “control” la temporada fría.

6.4.2 Análisis estadístico

Una vez cuantificados los transcritos, se realizaron las pruebas estadísticas correspondientes mediante el programa STATISTICA v10 (STATISTICA®, v10; StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Para verificar la normalidad de la distribución de los datos se llevó a cabo la prueba de Shapiro-Wilk, cuyos resultados mostraron que los datos no tienen una distribución normal ($W = 0.7844$, $p = 0.0001$). La prueba de homogeneidad de varianzas (Levene) mostró que los datos no tienen varianzas homogéneas ($F_{1,24} = 9.8714$, $p = 0.0044$). Debido a que los datos no cumplen con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, se utilizó un método no paramétrico (Kruskall-Wallis) para determinar si existen diferencias significativas por la hora del día y la temporada de colecta en los niveles de expresión de los genes. Se utilizó una significancia estadística de $p < 0.05$ en todos los casos.

7. RESULTADOS

Las mediciones de temperatura, salinidad y oxígeno disuelto para las temporadas cálida y fría se muestran en la figura 3. Se observó una variación mínima en los parámetros ambientales (temperatura, oxígeno disuelto y salinidad) a lo largo del día; mientras que la variación de temperatura fue más evidente entre temporadas (Tabla IV). La temperatura fue significativamente mayor durante la temporada cálida ($t = -5.976$, $g.l. = 43$, $p < 0.001$), la misma tendencia se observó para la salinidad ($t = 2.7938$, $g.l. = 43$, $p = 0.0077$). Por el contrario, la concentración de oxígeno disuelto fue mayor durante la temporada fría ($t = 79.0124$, $g.l. = 43$, $p < 0.001$).

Tabla IV. Promedio y desviación estándar de los parámetros ambientales registrados en Punta Diablo, Bahía de La Paz, Baja California Sur durante la temporada cálida (octubre 2017) y la temporada fría (abril 2018).

	O₂ disuelto (mg/L)	Salinidad (ppm)	Temperatura (°C)
Temporada cálida	5.19 ±0.98	35.62 ±0.57	28.98 ±0.23
Temporada fría	6.43 ±0.29	35.26 ±0.26	22.63 ±0.30

En la temporada cálida, durante el ciclo diurno la temperatura presentó un máximo de 29.2 °C y un mínimo de 28.3 °C; la concentración de oxígeno disuelto presentó un máximo de 6.2 mg L⁻¹ y un mínimo de 3.3 mg L⁻¹; la salinidad presentó un máximo de 35.9 ppm y un mínimo de 33.4 ppm (Fig. 3). En la temporada fría, la temperatura durante el ciclo diurno presentó un máximo de 23.3 °C y un mínimo de 22.3 °C; la concentración de oxígeno disuelto presentó un máximo de 6.86 mg L⁻¹ y un mínimo de 5.74 mg L⁻¹; la salinidad presentó un máximo de 35.5 ppm y un mínimo de 34.9 ppm (Fig. 3).

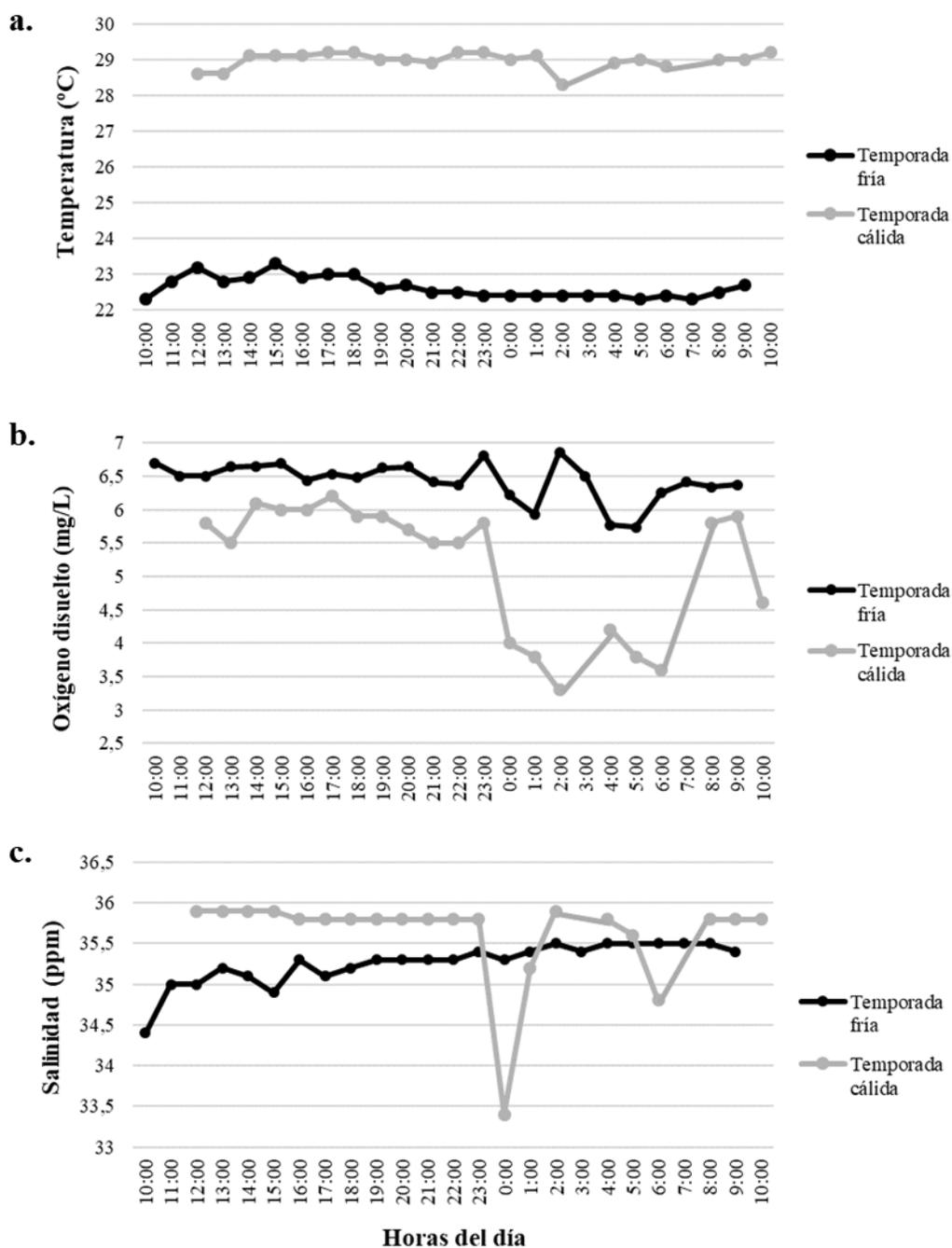


Figura 3. Registros de variables físicas del agua a lo largo del día de muestreo en la temporada cálida (octubre 2017) y fría (abril 2018) realizado en Punta Diablo, La Paz, Baja California Sur. a) Temperatura (°C), b) concentración de oxígeno disuelto (mg L^{-1}) y c) salinidad (ppm) registradas.

7.1 Colecta de organismos

En el muestreo correspondiente a la temporada cálida se obtuvieron un total de 460 peces crípticos; en la temporada fría se obtuvieron un total de 231 individuos. Los peces colectados fueron identificados taxonómicamente con el fin de conocer la abundancia por especie y por hora de muestreo. Las abundancias por especie se muestran en la figura 4.

En el muestreo correspondiente a la temporada cálida se obtuvieron un total de 460 peces crípticos pertenecientes a 13 especies diferentes. Durante la temporada fría se obtuvieron un total de 231 individuos pertenecientes a 13 especies. Las abundancias por especie se muestran en la figura 4.

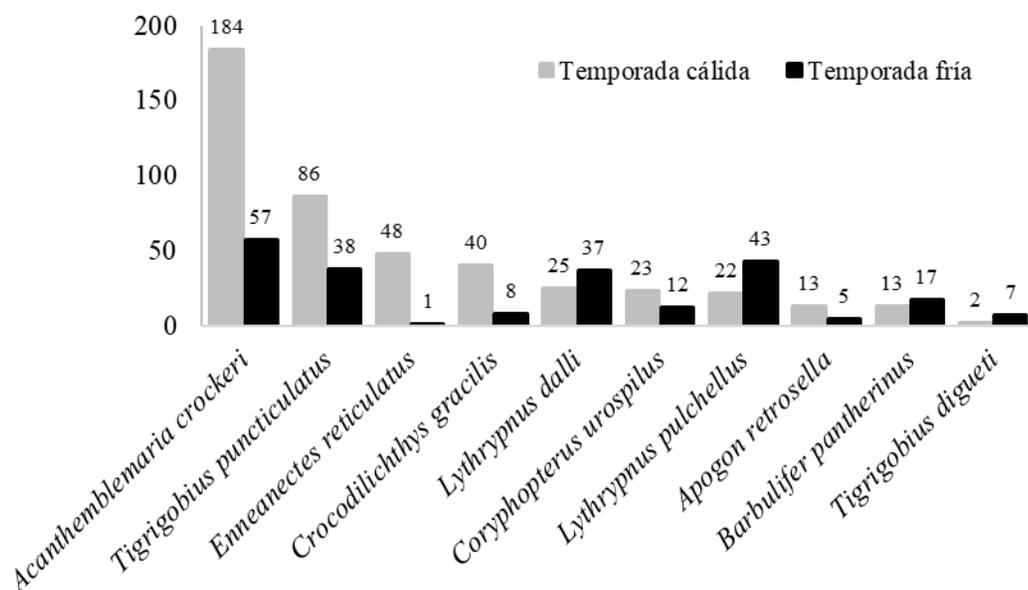


Figura 4. Especies crípticas y número de individuos por especie capturados en Punta Diablo, La Paz, Baja California Sur, en temporada cálida (octubre 2017) y fría (abril 2018).

Del total de especies en la temporada cálida, sólo seis se presentaron en todas las horas de colecta y fueron *Acanthemblemaria crockeri*, *Tigrigobius puncticulatus*, *Enneanectes reticulatus*, *Crocodilichthys gracilis*, *Lythrypnus pulchellus* y *Barbulifer pantherinus*, siendo las especies más abundantes *A. crockeri* ($n = 184$) y *T. puncticulatus* ($n = 86$) (Fig. 5a). En la temporada fría, sólo cuatro especies se presentaron en todas las horas

de colecta y fueron también las más abundantes, *A. crockeri* (n = 57), *L. pulchellus* (n=43), *T. puncticulatus* (n = 38) y *L. dalli* (n = 37) (Fig. 5b).

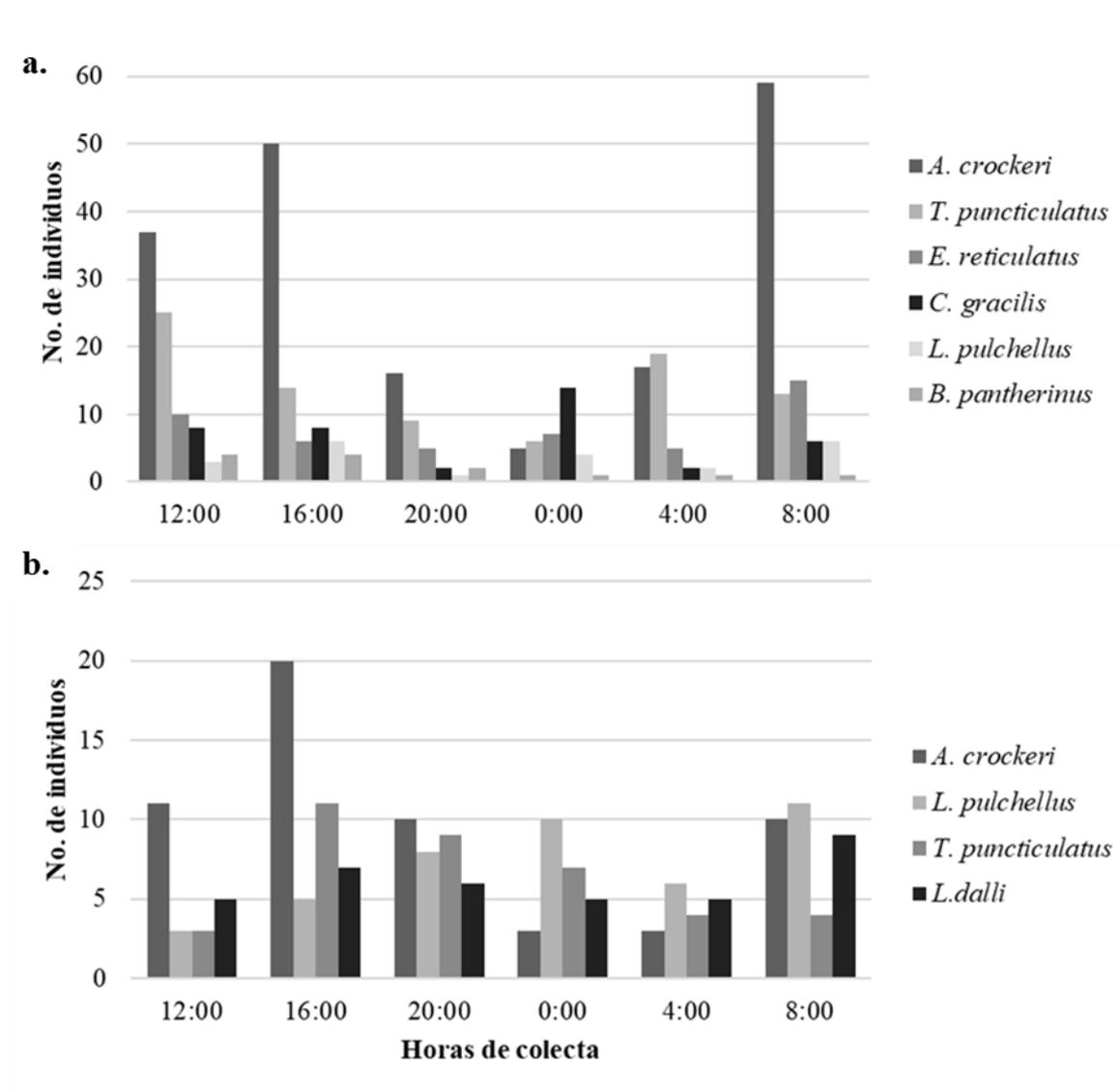


Figura 5. Especies presentes en todas las horas de colecta y abundancia por especie en Punta Diablo, La Paz, Baja California Sur, en a) temporada cálida (octubre 2017) y b) fría (abril 2018).

De la especie de interés *L. dalli*, se obtuvieron un total de 62 individuos. En la temporada cálida, se obtuvieron 25 individuos de *L. dalli*, los cuales sólo se encontraron en cuatro de las seis colectas realizadas a lo largo del día. En la temporada fría, se obtuvieron

37 organismos de *L. dalli* a lo largo del periodo de colecta. La abundancia por hora de colecta se muestra en la figura 6.

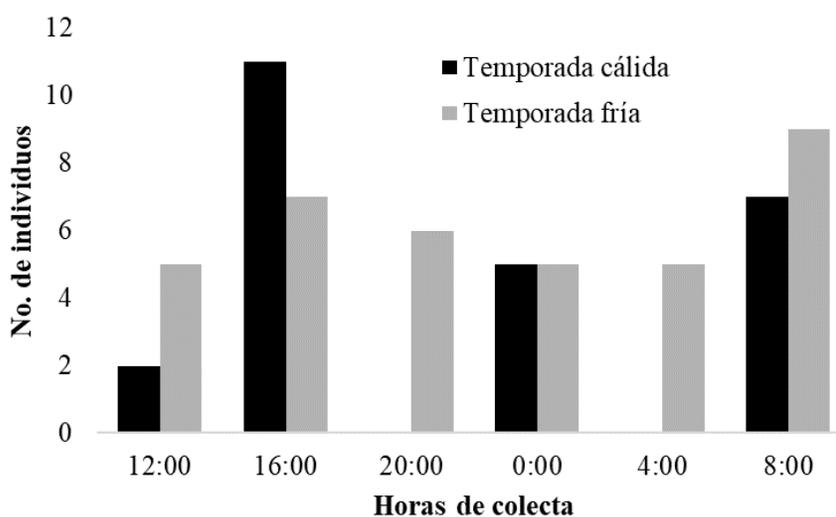


Figura 6. Abundancia de *Lythrypnus dalli* a lo largo del día, en temporada cálida (octubre 2017) y fría (abril 2018) en Punta Diablo, La Paz, Baja California Sur.

7.2 Trabajo de laboratorio

7.2.1 Extracción y verificación de ARN total.

Se realizó la extracción de ARN de un total de 47 individuos completos. La concentración promedio de ARN por muestra se muestra en el Anexo 2. La cuantificación de ARN se realizó mediante espectrofotometría a 260 nm y la relación 260/280 estuvo entre 1.57 y 2.1, siendo para la mayoría de las muestras >1.8 . Esta relación permite conocer si existe contaminación por proteínas o ADN (relaciones <1.8 señalan contaminación por proteínas, y coeficientes >2.1 señalan presencia de ADN genómico).

En la figura 7, se observa la calidad del ARN obtenido de siete muestras, inferida a partir de la presencia de dos bandas características de las subunidades ribosomales (18 y 28s). La calidad de ARN obtenido se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa-Synergel® al 1%.

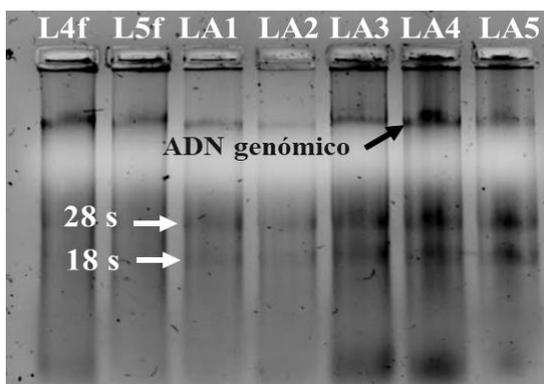


Figura 7. Imagen representativa de electroforesis en gel de agarosa/Synergel 1% en TBE-DEPC del ARN total obtenido de 7 muestras de *Lythrypnus dalli* capturados en Punta Diablo, La Paz, Baja California Sur. La integridad del material genético de las muestras L4f a LA5 se define a partir de la presencia de las subunidades ribosomales (18 y 28s).

La ausencia de contaminación con ADN en las muestras extraídas se analizó en diez muestras de ARN tomadas al azar. En la figura 8, se muestra el perfil electroforético de los productos de PCR usando ARN total como templado y oligonucleótidos del gen 16s. Como control positivo (+) se utilizó ADN de la misma especie. La presencia de productos de amplificación sugiere la presencia de ADN genómico (ADNg) contaminante en la mayoría de las muestras, por lo cual fue necesario realizar un protocolo de remoción de ADNg antes de llevar a cabo la síntesis de ADNc. Una vez limpias, las muestras ya no presentaron ningún producto de amplificación.

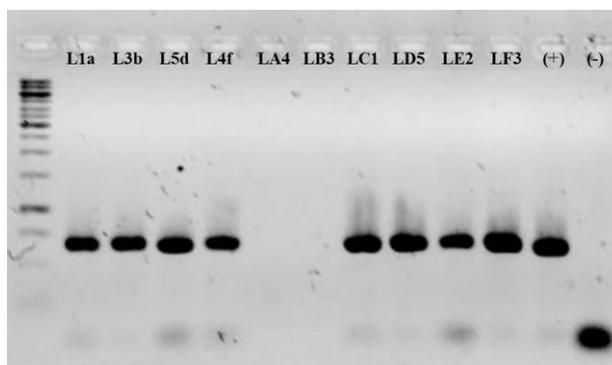


Figura 8. Perfil electroforético en gel de agarosa/Synergel al 1% en TBE 1X de productos de PCR usando como templado ARN de *Lythrypnus dalli* muestreados en Punta Diablo, La Paz, Baja California Sur. Línea 1, marcador de peso molecular 1 Kb; líneas 2 a 11, muestras de ARN; línea 12, muestra de ADN como control positivo, línea 13 (-) control negativo.

7.2.2 Optimización de PCR punto final

Se llevó a cabo una optimización de las condiciones de PCR con el fin de obtener los productos de amplificación de los genes de interés. Una de las condiciones que se manipuló fue la temperatura de alineamiento (T.a.). A mayor T.a., mayor es la especificidad de la reacción, con lo cual disminuye la generación de fragmentos poco específicos. Los productos de amplificación se observan como bandas en la imagen de gel de electroforesis (Fig. 9).

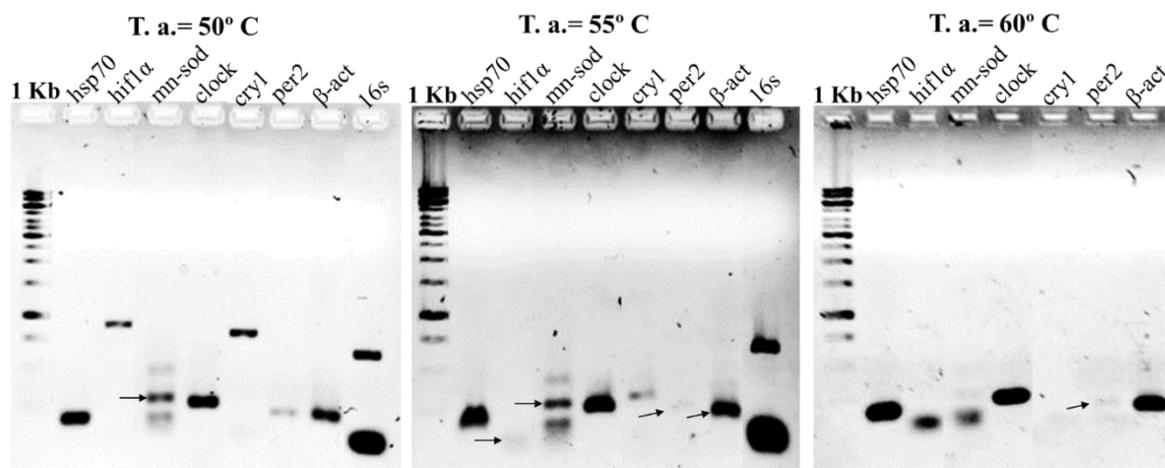


Figura 9. Productos de amplificación para los genes de interés (hsp70, hif1 α , Mn-sod, clock, cry1 y per2) y el gen de referencia (β -actina) usando como templado ADNc de *Lythrypnus dalli* capturados en Punta Diablo, La Paz, Baja California Sur. Línea 1: marcador molecular 1 kb; gen 16s, control positivo. Electroforesis en gel de agarosa/Synergel al 1% en TBE 1X. Las flechas indican los productos de interés de acuerdo al tamaño esperado.

El análisis de las secuencias obtenidas a partir de los productos de amplificación corroboró que se trataban de los genes de interés. Mediante el alineamiento de las secuencias, se observó un alto porcentaje de identidad (>80%) respecto a secuencias homólogas de otras especies. Los resultados del análisis y el nombre de las secuencias homólogas se muestran en la tabla V.

Tabla V. Análisis de identidad de las secuencias de interés de *Lythrypnus dalli*.

Gen	Nombre	Identidad	Valor-E (E-value)
hsp70	<i>heat shock protein 70</i>	92%	9E ⁻⁵¹
hif1a	<i>hypoxia inducible factor 1 alpha subunit (hif1a)</i>	89%	2E ⁻¹⁰
Mn-sod	<i>manganese superoxide dismutase</i>	83%	3E ⁻³¹
clock	<i>circadian locomoter output cycles protein kaput-like</i>	90%	3E ⁻²⁷
cry1	<i>cryptochrome-1-like</i>	92%	4E ⁻⁴¹
per2	<i>period circadian protein homolog 2-like</i>	87%	3E ⁻²²
β-actina	<i>beta-actin</i>	86%	6E ⁻⁴⁸

7.2.3 Análisis de la expresión cuantitativa mediante PCR en tiempo real (qPCR)

Para la estandarización del análisis por qPCR se procuró realizar curvas estándar de cada uno de los genes. Sin embargo, sólo fue posible obtener la curva estándar de hsp70 además del gen de referencia (β-actina). Con base en estos resultados, de los seis genes de respuesta amplificados por PCR en punto final, sólo el gen hsp70 fue considerado para el análisis de expresión mediante qPCR. Los resultados de este análisis se muestran en la tabla VI. Los valores de Ct se distribuyeron entre 28 y 34 para ambos genes. Las curvas estándar exhibieron coeficientes de correlación (R^2) mayores a 0.96 y la eficiencia de las reacciones fue mayor a 2.

Tabla VI. Análisis de la eficiencia de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).

Gen	Pendiente	R ²	Eficiencia	Porcentaje
hsp70	-2.3344	0.9699	2.68	168.15
β-actin	-2.6816	0.999	2.36	136.00

La especificidad de la amplificación de cada uno de los cebadores fue corroborada analizando las curvas de disociación generadas. Estas últimas mostraron el producto de amplificación formado durante la corrida de qPCR, representado por el pico de mayor tamaño. En las figuras 10 y 11 se muestran las curvas de disociación, así como las temperaturas de fusión de los genes analizados, las cuales fueron de 87 °C para β -actina y 88 °C para hsp70. Estas temperaturas de disociación fueron corroboradas con curvas realizadas a partir de producto de PCR, donde se obtuvo un solo pico para cada gen evaluado (Fig. 12). Caso contrario, cuando se analizaron las muestras usando ADNc se observó un segundo pico derivado de los oligonucleótidos.

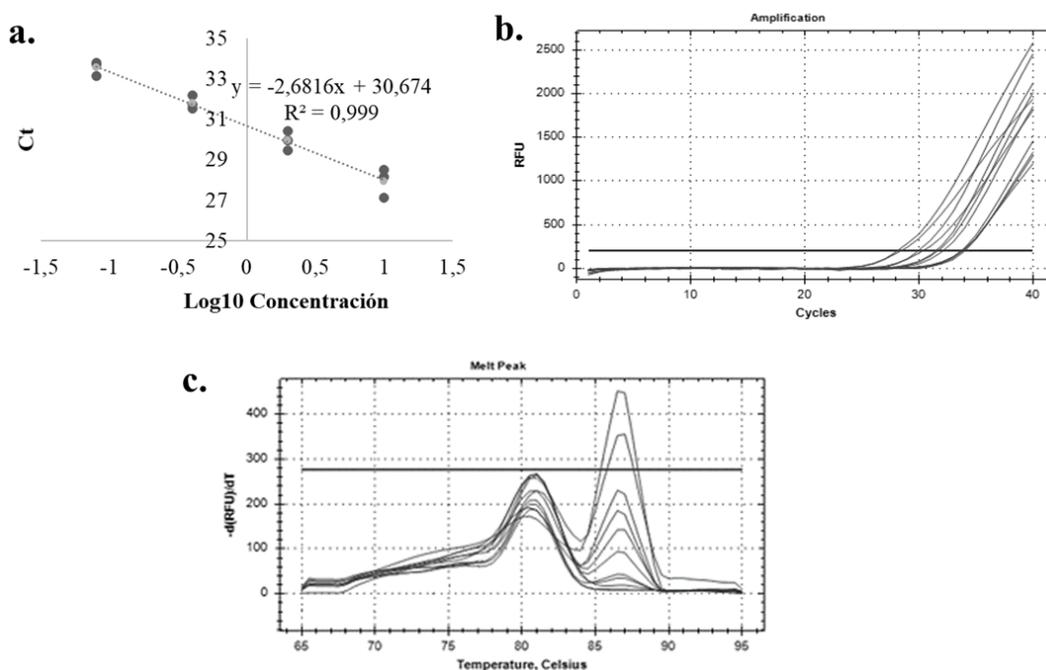


Figura 10. Curva estándar para el gen de referencia (β -actina). **a)** Regresión lineal, **b)** curva de fluorescencia, y **c)** curva de disociación.

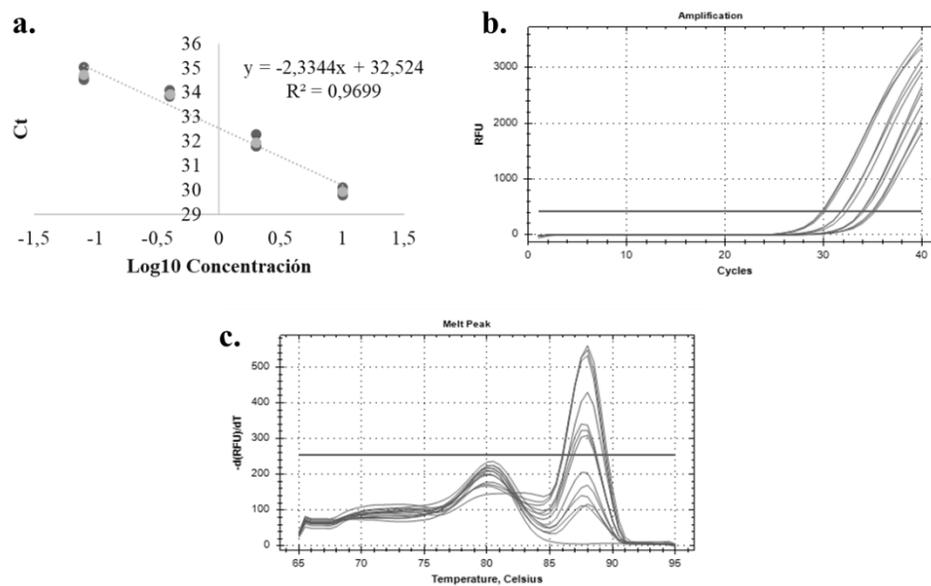


Figura 11. Curva estándar para el gen hsp70. **a)** Regresión lineal, **b)** curva de fluorescencia y **c)** curva de disociación.

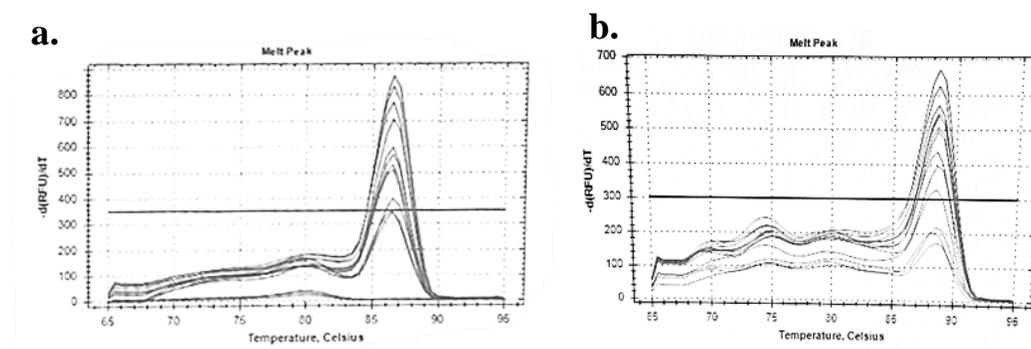


Figura 12. Curvas de disociación obtenida por producto de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para los genes hsp70 **(a)** y β -actina **(b)**.

A partir del análisis de las muestras se determinó la respuesta temporal a escala diurna y estacional de *L. dalli*, a través de los niveles de expresión del gen hsp70. El análisis de expresión se realizó para las muestras de ADNc generadas a partir del ARN extraído de 47 organismos; de éstas, sólo 25 amplificaron durante el análisis de qPCR. Estos últimos son los datos con los que se realizaron los análisis estadísticos. En términos generales, se observó

una ligera variación en ambas escalas que no en todos los casos fue estadísticamente significativa.

Los niveles de expresión de hsp70 mostraron diferencias significativas entre temporadas de acuerdo con la prueba de Kruskal-Wallis ($H_{1,25} = 9,9526$; $p = 0,0016$). Los niveles fueron mayores en la temporada cálida, como se puede observar en la figura 13. También se analizó el efecto de la hora del día, en ambas temporadas (Figs. 14 y 15). No se observaron diferencias significativas durante las diferentes horas del día en la temporada cálida ($H_{3,12} = 3,0038$; $p = 0,3910$), ni en la temporada fría ($H_{5,13} = 8,6703$; $p = 0,1230$).

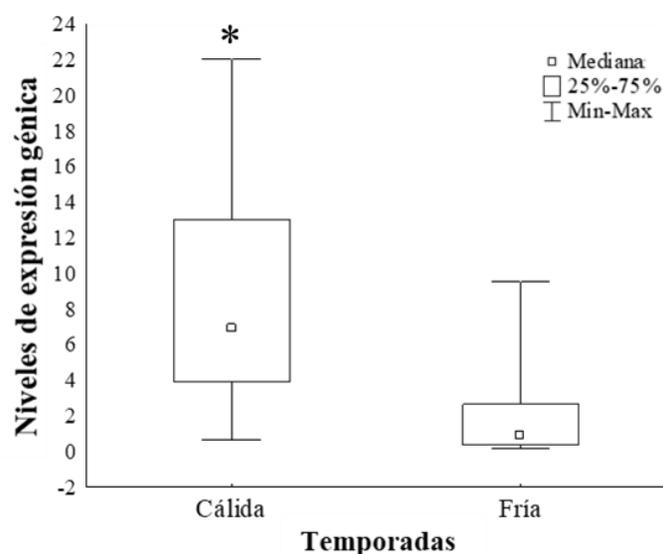


Figura 13. Análisis de expresión del gen hsp70 en muestras de *Lythrypnus dalli* capturados en Punta Diablo, La Paz, Baja California Sur en las temporadas cálida ($n = 12$) y fría ($n = 13$) mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR). Los valores se muestran como una expresión normalizada en base al gen de referencia (β -actina). Los datos se presentan como mediana y percentiles, mientras que el asterisco indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

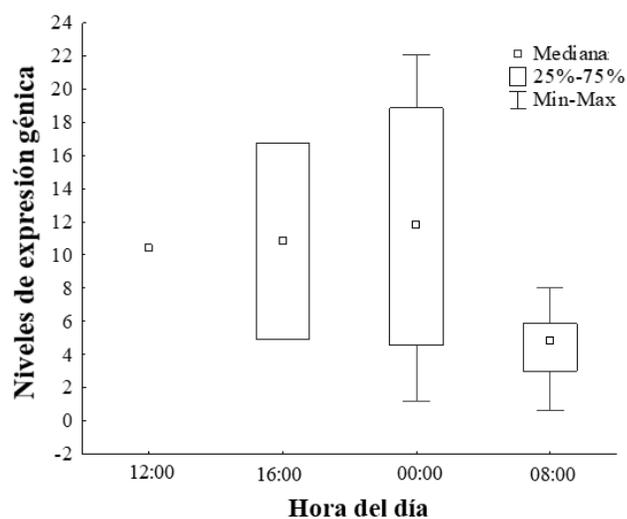


Figura 14. Análisis de expresión del gen hsp70 en muestras de *Lythrypnus dalli* capturados en Punta Diablo, La Paz, Baja California Sur, a lo largo del día durante la temporada cálida (n=12), mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR). Los valores se muestran como una expresión normalizada en base al gen de referencia (β -actina). Los datos se presentan como mediana y percentiles.

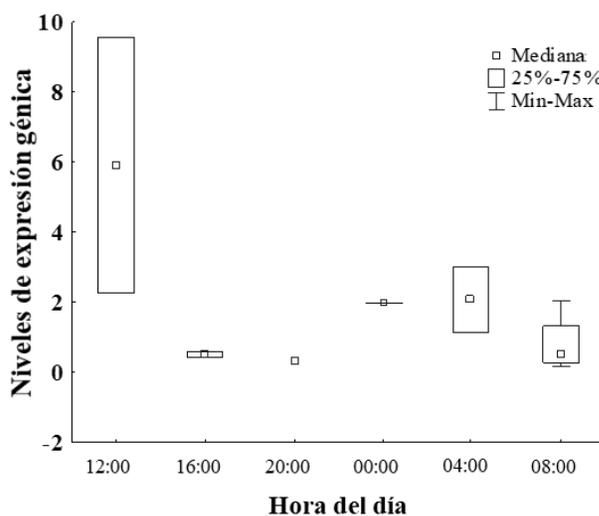


Figura 15. Análisis de expresión del gen hsp70 en muestras de *Lythrypnus dalli* a lo largo del día durante la temporada fría (n=13) mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR). Los valores se muestran como una expresión normalizada en base al gen de referencia (β -actina). Los datos se presentan como mediana y percentiles.

8. DISCUSIÓN

El método de qPCR ha demostrado ser una técnica muy sensible, rápida y altamente recomendada para detectar cambios cuantitativos en los niveles de expresión génica entre varias muestras (Vinueza-Burgos, 2009). A pesar de ser una técnica sensible y confiable, pueden presentarse dificultades que complican la reacción produciendo resultados no adecuados. Esto se debe a que cada reacción es un experimento único y, por tanto, las condiciones óptimas requeridas para generar un producto específico pueden variar (Udvardi *et al.*, 2008). Entre las dificultades más comunes que impiden una amplificación exitosa se encuentran las fallas en la reacción, contaminación, baja calidad del templado, concentraciones inapropiadas, falla en la detección de la fluorescencia, presencia de inhibidores, reactivos incorrectos, entre otros (Nolan *et al.*, 2013).

En el presente estudio no fue posible llevar a cabo la amplificación de algunos genes de interés (*hif1 α* , *mn-sod*, *clock*, *cry1*, *per2*) mediante qPCR. El problema fue detectado al obtener curvas estándar anormales (Cts similares entre diluciones, Cts tardíos, falsos negativos), que aparentemente no se debían a la calidad del templado o los reactivos. En cierto punto se detectó una potencial contaminación por ADNg, sin embargo, esto fue corregido al llevar a cabo una limpieza de las muestras con ADNasa. Ello, sin embargo, no mejoró las curvas estándar de los genes de interés, a excepción del gen *hsp70* con el cual se continuó el análisis. La presencia de dímeros, así como la amplificación fallida de algunas muestras, fueron algunas dificultades que se observaron al intentar amplificar las muestras.

Para obtener resultados óptimos en el análisis de estos genes mediante qPCR, sería necesario llevar a cabo una optimización de las condiciones en las que se lleva a cabo la reacción (Nolan *et al.*, 2013). La optimización consiste en un ajuste de las condiciones de amplificación (temperaturas y tiempos de desnaturalización, alineamiento y extensión, número de ciclos, cantidad de templado, entre otros), además de las concentraciones de los componentes de la reacción (ADN, Taq polimerasa, MgCl₂, dNTPs, oligonucleótidos, etc.) con el fin de obtener especificidad y reproducibilidad en la técnica (Edwards, 2005). Es posible que para amplificar los genes de interés antes mencionados, se deba realizar una

optimización más extensiva, de manera que se pongan a prueba todos los factores antes mencionados, incluidas las concentraciones y la eficiencia de los componentes de la reacción.

El cambio en la expresión de los genes que codifican las HSPs ante cambios térmicos, particularmente la Hsp70, en condiciones de laboratorio ha sido una respuesta ampliamente estudiada en varias especies de peces (Hassan *et al.*, 2017; Heredia-Middleton *et al.*, 2008; Lewis *et al.*, 2016; Logan y Somero, 2011; Lund *et al.*, 2002; Podrabsky, 2004; Tunnah *et al.*, 2017; Yamashita *et al.*, 2010). Sin embargo, es escasa la información acerca de la expresión de hsp70 como respuesta de los organismos ante los cambios térmicos propios de su ambiente natural, y más escasa aún, acerca del efecto que tiene la temporalidad en la modulación de hsp70.

En el presente estudio, los niveles de expresión de hsp70 en *L. dalli* fueron significativamente mayores durante la temporada cálida. Es posible que esta regulación positiva de hsp70 esté relacionada con el cambio de la temperatura, el cual fue de aproximadamente 6 °C mayor en la temporada cálida que en la temporada fría. En *Epinephelus coioides* y *Sparus aurata*, se reportó que los niveles de hsp70, 90 y 47 fueron mayores en verano que en invierno en el canal de Suez, Egipto, cuando la temperatura tiene un incremento de 23 a 28 °C (Guerriero *et al.*, 2018). Lund *et al.* (2002) también reportan inducción en la expresión de hsp70 en *Salmo salar* durante las condiciones cálidas de verano en Agosto (27 °C) respecto a los niveles control de primavera en Junio (20 °C) en su hábitat natural, el río Miramichi, Canadá.

La modulación en los niveles de expresión de hsp70 en *L. dalli* observados en el presente estudio puede tener un papel citoprotector como mecanismo de aclimatación ante la variabilidad estacional de temperatura. La expresión del gen hsp70 es crítica para el mantenimiento de las funciones celulares, ya que participa en el plegamiento de las proteínas dañadas térmicamente previniendo su agregación citotóxica (Feder y Hofmann, 1999). Los mecanismos involucrados en la detección del cambio en la temperatura y en la inducción de la expresión del gen con el consecuente aumento en la concentración de la proteína, no son

del todo claros. Sin embargo, algunos estudios sugieren que la regulación de la expresión de hsp70 ocurre principalmente a nivel transcripcional (Silver y Noble, 2012).

La transcripción de los genes que codifican para hsp70 es promovida por un factor de transcripción (heat shock factor o HSF) (Hofmann, 2005). El cambio en la temperatura promueve la transactivación del HSF mediante su trimerización en el citoplasma, translocación hacia el núcleo y posterior unión “upstream” a un elemento palindrómico (heat shock element o HSE) de los genes que codifican a Hsp70 (Basu *et al.*, 2002). La unión del HSF1 al ADN es necesaria, pero no es suficiente para su transactivación; los mecanismos para la activación del complejo transcripcional incluyen la hiperfosforilación del HSF1 y la eliminación de un complejo inhibidor de hsp90 que interactúa con los homotrímeros de HSF1 que se forman en el núcleo (Durham, 2008). Se ha sugerido que una vez activado el complejo transcripcional, el HSF1 promueve la liberación de la ARN polimerasa II (Pol-II) del complejo de iniciación pre-transcripcional que se encuentra pausado por el HSE, comenzando así la elongación del ARNm de hsp70 (Silver y Noble, 2012; Voellmy, 2004).

En contraste con lo reportado para *L. dalli* en el presente estudio, en peces como *Sparus aurata* se ha observado un patrón estacional diferente en la expresión de hsp70 y hsp90; en dicha especie, los niveles de expresión de hsp70 y hsp90 incrementan al inicio de la primavera (marzo) cuando la temperatura alcanzaba su mínimo (11°C) (Feidantsis *et al.*, 2013). Este último estudio coincide con lo reportado por Fader *et al.* (1994) quien observó una mayor inducción de la hsp70 en cuatro especies de peces (*Pimephales promelas*, *Salmo trutta*, *Ictalurus natalis* y *Ambloplites rupestris*) durante la primavera en mayo (14.5 – 17.3 °C) ante un incremento de la temperatura de hasta 16 °C respecto a invierno en febrero (0.6 – 4 °C) en Valley Forge, Pensilvania; los niveles de hsp70 disminuyeron significativamente en agosto durante el verano (19.2 - 25 °C), a pesar de que la temperatura tuvo un aumento de hasta 7.7 °C respecto a primavera. Hassan *et al.* (2017) no encontraron diferencias en los niveles de la expresión génica de hsp70 entre las condiciones de verano en agosto (36 °C) e invierno en diciembre (14 °C) en la tilapia *Oreochromis niloticus* de la provincia de Kaferelsheik, Egipto. Las diferencias entre estos resultados y los reportados en el presente estudio sugieren que el umbral de temperatura al cual se intensifica la expresión de los genes

que codifican las hsp depende de la temperatura a la cual los organismos están aclimatados y, por tanto, varía entre las diferentes especies y poblaciones (Buckley y Hofmann, 2002; Dietz, 1994).

El efecto de la variabilidad térmica puede diferir entre especies, e incluso poblaciones, según la tolerancia y plasticidad fenotípica derivadas de la aclimatación a las condiciones térmicas que prevalecen en su medio (Veilleux *et al.*, 2018). Algunos organismos que habitan ambientes con una alta variabilidad térmica, tienen una mayor capacidad para modular los niveles de expresión de algunas hsp, incluida la hsp70 (Jesus *et al.*, 2013; Logan y Somero, 2011). Por el contrario, los organismos que habitan en rangos térmicos más estrechos (regiones tropicales o polares) tienden a carecer de una respuesta de choque térmico al ser expuestos a cambios térmicos agudos (Hofmann, 2005; Veilleux *et al.*, 2018).

Los parámetros ambientales reportados en el presente estudio realizado en Punta Diablo, sugieren una marcada variación estacional, particularmente en la temperatura. Se registró un valor mínimo en la temporada fría de 22.3 °C y una temperatura máxima en la temporada cálida de 29.2 °C. Esta variabilidad presentó un patrón similar reportado por otros autores (Bernal *et al.*, 2001; Martínez-Flores, 2007; Martínez-López *et al.*, 2001) quienes, además, observan temperaturas máximas de agosto a octubre de 30 a 31 °C, y mínimas de enero a marzo de 21 a 24 °C. Un estudio más reciente en la Bahía de La Paz obtiene datos *in situ* más precisos y reporta una temperatura mínima de 20.11 °C en invierno (enero - febrero) y una máxima de 29.35 °C en verano (agosto - octubre) (Aviña, 2018). De acuerdo a lo anterior, la población de *L. dalli* que habita en la Bahía de La Paz estaría enfrentándose a una variabilidad en la temperatura ambiental dentro de un rango de hasta 10 °C. Es posible que *L. dalli* pudiera haber desarrollado una mayor tolerancia y plasticidad en la respuesta térmica que se refleja a través de la modulación de los niveles de expresión de hsp70. Se requieren más estudios para determinar los límites de tolerancia de la especie y saber si existe una relación entre éstos y la temperatura a la cual se induce la expresión de este hsp70.

En el presente estudio, la salinidad y los niveles de oxígeno disuelto se mantuvieron relativamente estables entre temporadas. La variación de la salinidad en Punta Diablo fue

mínima (0.36 ppm). Esta tendencia ya se había descrito para la Bahía de La Paz, por Obeso-Nieblas *et al.* (2004), quienes reportan que la salinidad se mantuvo homogénea a través del año y entre años; si acaso, encontraron ligeras variaciones geográficas. En el caso del oxígeno disuelto, los datos estacionales son escasos; Aviña (2018) reporta que durante los meses de enero a abril (2017) se presentaron las mayores concentraciones de oxígeno disuelto (6.13 mg L⁻¹) en la Bahía, mientras que las menores concentraciones (3.63 mg L⁻¹) se presentaron de agosto a septiembre. En el presente estudio, la variación en la disponibilidad de oxígeno disuelto fue mínima (1.2 mg L⁻¹) a pesar de que se observaron diferencias significativas entre temporadas. Es evidente que la estacionalidad en el área de estudio está marcada por la temperatura, por ello se sugiere a este factor como el principal modulador de la respuesta molecular de *L. dalli*.

Los organismos acuáticos no sólo están expuestos a una variabilidad ambiental estacional, sino también en una escala diurna. No obstante, la respuesta ante estas condiciones fluctuantes en comparación con condiciones constantes ha sido poco estudiada. En el presente estudio, no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de hsp70 a lo largo del día, en ninguna de las dos temporadas. Si bien, la variabilidad ambiental a la que están expuestos los organismos acuáticos en una escala diurna también puede inducir una respuesta, esta respuesta va a depender de la magnitud del cambio.

Las fluctuaciones diurnas en la temperatura superficial en la Bahía de La Paz presentan diferencias dependiendo de la época del año; en los meses más fríos las diferencias son de aproximadamente 1 °C, mientras que en el período cálido son de hasta 2 °C (Martínez-Flores (2007). Esto coincide con lo registrado en el presente estudio, la variación diurna registrada en Punta Diablo durante los días de muestreo fue de 1 °C en ambas temporadas. Los niveles de salinidad se mantuvieron estables; sin embargo, el oxígeno disuelto presentó una disminución de hasta tres unidades (de 6.2 a 3.3 mg L⁻¹) durante las 0:00 y las 06:00 horas en la temporada cálida. Algunos autores mencionan que el estrés por hipoxia puede ocurrir cuando el nivel de oxígeno disuelto cae por debajo de los niveles de supervivencia, comúnmente a 2.0 mg L⁻¹ o menos (Pollock *et al.*, 2007; Vaquer-Sunyer y Duarte, 2008). Las ligeras variaciones en la concentración de oxígeno disuelto observadas en el presente

estudio parecen no haber sido suficientes para inducir la respuesta de hsp70 en *L.dalli* a lo largo del día.

En contraste con lo observado en el presente estudio, en otras especies marinas se han reportado oscilaciones diarias en la expresión de las hsps. Oren *et al.* (2015) observaron que los niveles de expresión de hsp70 y hsp90 en la anemona *Nematostella vectensis* presentan una marcada regulación diurna, alcanzando una máxima expresión de estos genes durante la noche (0:00 horas). Los autores sugieren que estos organismos tienen mecanismos circadianos que permiten una respuesta de compensación térmica ante las condiciones cambiantes del medio. Esta respuesta permite a los organismos prevenir que una serie de funciones fisiológicas cambien con la temperatura. En el coral *Acropora millepora* también se observa una oscilación en la expresión de hsp70 y hsp90, sólo que la expresión máxima de estos transcritos fue durante la tarde (16:00 horas); esto se atribuyó a la defensa contra el potencial estrés oxidativo que surge a raíz del proceso de fotosíntesis realizada por los simbiontes del coral (Levy *et al.*, 2011).

En mejillones intermareales (*Mytilus californianus*) la expresión de hsp70 aumenta durante las horas de marea baja (Connor y Gracey, 2011). En estas condiciones los mejillones quedan expuestos al calor, desecación e hipoxia. De acuerdo a los autores, *M. californianus* exhibe una transcripción programada como una respuesta anticipatoria ante los patrones térmicos del medio. Si bien, en los estudios anteriores se observan oscilaciones diurnas en la expresión de las hsps, ésta parece depender de la magnitud, duración y tipo de estresores a los que se enfrentan los organismos en su hábitat. Si esta modulación es una respuesta “entrenada”, aún no queda claro; se necesitaría mayor evidencia y conocer a fondo los mecanismos subyacentes.

Se han analizado diferentes mecanismos para hacer frente a la variabilidad ambiental para entender las bases del estrés letal y subletal, las diferencias que existen entre especies y su capacidad de respuesta (Evans y Hofmann, 2012). Sin embargo, los resultados coinciden en que los organismos presentan una respuesta fisiológica óptima dentro de un rango limitado en la condiciones ambientales, y umbrales en los que el desempeño fisiológico se ve

comprometido o finalmente se pierde. Este tipo de datos son importantes para evaluar qué tan vulnerables son los organismos ante cambios climáticos y, por tanto, muy útiles en el contexto de la conservación (Hoey *et al.*, 2016; Illing y Rummer, 2017).

Se espera que los océanos tropicales aumenten su temperatura hasta 3 °C a fines de siglo, lo cual representa un reto muy grande para todos los organismos arrecifales especialmente aquellos de bajas latitudes (Rummer *et al.*, 2014). Los organismos marinos pueden mostrar tres posibles respuestas ante las condiciones ambientales proyectadas para el futuro. La primera, pueden dispersarse a entornos más adecuados (migración); la segunda, los organismos pueden adaptarse a nuevos entornos a lo largo del tiempo a través del cambio genético (adaptación); y la tercera, pueden aprovechar sus capacidades para modificar su fenotipo y adaptarse mejor a las nuevas condiciones ambientales (plasticidad fenotípica) (Evans y Hofmann, 2012; Harborne, 2013).

Mientras que peces más grandes o conspicuos pueden desplazarse hacia condiciones más propicias, la capacidad de dispersión limitada de los peces críticos los hace particularmente susceptibles a esos cambios (Brandl *et al.*, 2018; Munday *et al.*, 2017). Es posible, que estos organismos opten por modular su fenotipo y favorecer su capacidad de aclimatación. Sin embargo, debido a que se conoce relativamente poco sobre las respuestas fisiológicas y moleculares de los peces críticos, se requieren más estudios para elucidar la capacidad de aclimatación, los mecanismos involucrados y los rangos de tolerancia en diferentes escalas temporales, pero también en una escala espacial, en este grupo de peces.

9. CONCLUSIONES

- La especie de estudio *Lythrypnus dalli* no se encontró en todas las horas de muestreo; sin embargo, fue una de las especies más abundantes en las dos temporadas (cálida y fría) de colecta.
- Se observó una variación mínima en los parámetros ambientales (temperatura, oxígeno disuelto, salinidad) a lo largo del día.
- Se observó una marcada variación estacional en los parámetros ambientales (temperatura, oxígeno disuelto, salinidad).
- En el área de estudio, la temperatura fue el factor con mayor variabilidad estacional; la diferencia fue de hasta 6 °C entre las temporadas, lo cual sugiere que este factor es el principal modulador del gen hsp70 en *L. dalli*.
- Los niveles de expresión del gen hsp70 fueron significativamente mayores durante la temporada cálida, posiblemente relacionado con la capacidad de *L. dalli* ante los cambios térmicos estacionales.
- No se observaron diferencias significativas entre los niveles de expresión del gen hsp70 a lo largo del día en ninguna de las temporadas (cálida y fría) estudiadas; ello sugiere que la variación ambiental diurna no es suficiente para inducir una respuesta de hsp70 en *L. dalli*.
- Aparentemente, *L. dalli* ha desarrollado una plasticidad fenotípica que le permite enfrentar la variabilidad ambiental, esto se refleja en la modulación de los niveles de expresión de hsp70 como parte de una respuesta de aclimatación a las condiciones ambientales.

10. LITERATURA CITADA

Allen, G. R., D. R. Robertson. 1994. Fishes of the Tropical Eastern Pacific. University of Hawaii Press. Primera edición. Honolulu, Hawaii. 332 p.

Alves de Almeida, E., A. C. Dias Bainy, A. P. de Melo Loureiro, G. R. Martinez, S. Miyamoto, J. Onuki, L. Fujita Barbosa, C. C. Machado Garcia, F. Manso Prado, G. E. Ronsein, C. A. Sigolo, C. Barbosa Brochini, A. M. Gracioso Martins, M. H. Gennari de Medeiros, P. Di Mascio. 2007. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 146: 588-600.

Amaral, I.P.G., I. A. Johnston. 2012. Circadian expression of clock and putative clock-controlled genes in skeletal muscle of the zebrafish. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* 302: R193-R206.

Andreani, T.S., T.Q. Itoh, E. Yildirim, D.-S. Hwangbo, R. Allada. 2015. Genetics of Circadian Rhythms. *Sleep Med. Clin.* 10: 413-421.

Archambeault, S., E. Ng, L. Rapp, D. Cerino, B. Bourque, T. Solomon-Lane, M. S. Grober, A. Rhyne, K. Crow. 2016. Reproduction, larviculture and early development of the Bluebanded goby, *Lythrypnus dalli*, an emerging model organism for studies in evolutionary developmental biology and sexual plasticity. *Aquac. Res.* 47: 1899-1916.

Arunraj, R., M. A. Samuel. 2018. Integration of amplification efficiency in qPCR analysis allows precise and relative quantification of transcript abundance of genes from large gene families using RNA isolated from difficult tissues. *Brief. Funct. Genomics.* 17: 147-150.

Arya, M., I. S. Shergill, M. Williamson, L. Gommersall, N. Arya, H. R. Patel. 2005. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 5: 209-219.

Aviña-Hernández, R. J. 2018. Estimación de parámetros ambientales a partir de imágenes Landsat 8 y mediciones *in situ*, en Bahía de La Paz, BCS. Tesis (Maestría en Ciencias). Baja California Sur, México. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. 87 p.

Basu, N., A. E. Todgham, P. A. Ackerman, M. R. Bibeau, K. Nakano, P. M. Schulte, G. K. Iwama. 2002. Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene.* 295: 173-183.

- Behrents, K.C. 1987. The influence of shelter availability on recruitment and early juvenile survivorship of *Lythrypnus dalli* Gilbert (Pisces: Gobiidae). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 107: 45-59.
- Bernal, G., P. Ripa, J. C. Herguera. 2001. Variabilidad Oceanográfica Y Climática En El Bajo Golfo De California : Influencias Del Trópico Y Pacífico Norte Oceanographic and Climatic Variability in the Lower Gulf of California: Links With the Tropics and North Pacific. *Ciencias Mar.* 27: 595-617.
- Boyle, G., K. Richter, H. D. Priest, D. Traver, T. C. Mockler, J. T. Chang, S. A. Kay, G. Breton. 2017. Comparative analysis of vertebrate diurnal/circadian transcriptomes. *PLoS One* 12: 1-18.
- Brandl, S. J., C. H. R. Goatley, D. R. Bellwood, L. Tornabene. 2018. The hidden half: Ecology and evolution of cryptobenthic fishes on coral reefs. *Biol. Rev.* 93 (4): 1846-1873.
- Buckley, B. A., A. Y. Gracey, G. N. Somero. 2006. The cellular response to heat stress in the goby *Gillichthys mirabilis*: a cDNA microarray and protein-level analysis. *J. Exp. Biol.* 209: 2660-77.
- Buckley, B. A., G. E. Hofmann. 2002. Thermal acclimation changes DNA-binding activity of heat shock factor 1 (HSF1) in the goby *Gillichthys mirabilis*: implications for plasticity in the heat-shock response in natural populations. *J. Exp. Biol.* 205: 3231-40.
- Buhr, E.D., J.S. Takahashi. 2013. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Handb. Exp. Pharmacol.* 217: 3-27.
- Cheng, C. H., F. F. Yang, S. A. Liao, Y. T. Miao, C. X. Ye, A. L. Wang, J. W. Tan, X. Y. Chen. 2015. High temperature induces apoptosis and oxidative stress in pufferfish (*Takifugu obscurus*) blood cells. *J. Therm. Biol.* 53: 172-179.
- Connor, K. M., A. Y. Gracey. 2011. Circadian cycles are the dominant transcriptional rhythm in the intertidal mussel *Mytilus californianus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108: 16110-16115.
- Culumber, Z. W., D. B. Shepard, S. W. Coleman, G.G. Rosenthal, M. Tobler. 2012. Physiological adaptation along environmental gradients and replicated hybrid zone structure in swordtails (Teleostei: Xiphophorus). *J. Evol. Biol.* 25: 1800-1814.

Dietz, T. J. 1994. Acclimation of the threshold induction temperatures for 70-kDa and 90-kDa heat shock proteins in the fish *Gillichthys mirabilis*. *J. Exp. Biol.* 188: 333-8.

Durham, H. D. 2008. Strategies for Conferring Neuroprotection and Countering the High Threshold for Induction of the Stress Response in Motor Neurons, p. 203-221. *En B. I. R. Asea A. A. (ed.). Heat Shock Proteins and the Brain: Implications for Neurodegenerative Diseases and Neuroprotection.* Springer Netherlands, Dordrecht. 123 p.

Edwards K. J. 2005. Performing Real-time PCR. En: Edwards, K., J. Logan, N. Saunders (eds.). *Real-Time PCR: An Essential Guide.* Horizon Bioscience Wymondham. London, U.K. pp 346.

Eissa, N., H. P. Wang, H. Yao, Z. G. Shen, A. A. Shaheen, E. N. Abou-ElGheit. 2017. Expression of Hsp70, Igf1, and three oxidative stress biomarkers in response to handling and salt treatment at different water temperatures in yellow perch, *Perca flavescens*. *Front. Physiol.* 8.

Evans, T.G., G.E. Hofmann. 2012. Defining the limits of physiological plasticity: how gene expression can assess and predict the consequences of ocean change. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 367: 1733-1745.

Fader, S. C., Z. Yu, J. R. Spotila. 1994. Seasonal variation in heat shock proteins (hsp 70) in stream fish under natural conditions. *J. Therm. Biol.* 19: 335-341.

Fangue, N. A., M. Hofmeister, P. Schulte. 2006. Intraspecific variation in thermal tolerance and heat shock protein gene expression in common killifish, *Fundulus heteroclitus*. *J. Exp. Biol.* 209: 2859-2872.

Feder, M. E., G. E. Hofmann. 1999. Heat shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61: 243-282.

Feidantsis, K., E. Antonopoulou, A. Lazou, H.O. Pörtner, B. Michaelidis. 2013. Seasonal variations of cellular stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *J. Comp. Physiol. B* 183: 625-639.

Froehlich, H. E., S. B. Roberts, T. E. Essington. 2015. Evaluating hypoxia-inducible factor-1 α mRNA expression in a pelagic fish, Pacific herring *Clupea pallasii*, as a biomarker for hypoxia exposure. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 189: 58-66.

- Galván-Villa, C. M. 2008. Peces críticos asociados a corales ramosos del género *Pocillopora* en el arrecife de Playa Mora, Bahía Tenacatita, México. *Cienc. y Mar* 11: 17-24.
- Gruber, R. K., R. J. Lowe, J. L. Falter. 2017. Metabolism of a tide-dominated reef platform subject to extreme diel temperature and oxygen variations. *Limnol. Oceanogr.* 62: 1701-1717.
- Guadayol, Ò., N. J. Silbiger, M. J. Donahue, F. I. M. Thomas. 2014. Patterns in temporal variability of temperature, oxygen and pH along an environmental gradient in a coral reef. *PLoS One* 9.
- Guerriero, G., S. M. Bassem, W. K.B. Khalil, T. A. Temraz, G. Ciarcia, F. K. A.- Gawad. 2018. Temperature changes and marine fish species (*Epinephelus coioides* and *Sparus aurata*): Role of oxidative stress biomarkers in toxicological food studies. *Emirates J. Food Agric.* 30: 205.
- Gunderson, A. R., E. J. Armstrong, J. H. Stillman. 2016. Multiple Stressors in a Changing World: The Need for an Improved Perspective on Physiological Responses to the Dynamic Marine Environment. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 8: 357-378.
- Harborne, A. R. 2013. The ecology, behaviour and physiology of fishes on coral reef flats, and the potential impacts of climate change. *J. Fish Biol.* 83: 417-447.
- Hassan, A., A. F. El Nahas, S. Mahmoud, M. E. Barakat, A. Y. Ammar. 2017. Thermal stress of ambient temperature modulate expression of stress and immune-related genes and DNA fragmentation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)). *Appl. Ecol. Environ. Res.* 15: 1343-1354.
- Heredia-Middleton, P., J. Brunelli, R.E. Drew, G. H. Thorgaard. 2008. Heat shock protein (HSP70) RNA expression differs among rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) clonal lines. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 149: 552-556.
- Hoey, A., E. Howells, J. Johansen, J. P. Hobbs, V. Messmer, D. McCowan, S. Wilson, M. Pratchett. 2016. Recent Advances in Understanding the Effects of Climate Change on Coral Reefs. *Diversity* 8: 12.
- Hofmann, G. E. 2005. Patterns of Hsp gene expression in ectothermic marine organisms on small to large biogeographic scales. *Integr. Comp. Biol.* 45: 247-255.

Ighodaro, O. M., O. A. Akinloye. 2017. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J. Med.* 1-7.

Illing, B., J.L. Rummer. 2017. Physiology can contribute to better understanding, management, and conservation of coral reef fishes. *Conserv. Physiol.* 5: 1-11.

Jesus, T. F., Â. Inácio, M. M. Coelho. 2013. Different levels of hsp70 and hsc70 mRNA expression in Iberian fish exposed to distinct river conditions. *Genet. Mol. Biol.* 36: 061-069.

Jong L. D., X. Moreau, A. Thiéry. 2008. Expression of heat shock proteins as biomarker tool in aquatic invertebrates: Actual knowledge and ongoing developments for the early detection of environmental changes and ecological risks, p. 375-392. *En Heat Shock Proteins: New Research.*

Koch, C. E., B. Leinweber, B. C. Drengberg, C. Blaum, H. Oster. 2017. Interaction between circadian rhythms and stress. *Neurobiol. Stress* 6: 57-67.

Kodama, K., M. Saydur Rahman, T. Horiguchi, P. Thomas. 2012. Upregulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α mRNA levels in dragonet *Callionymus valenciennae* exposed to environmental hypoxia in Tokyo Bay. *Mar. Pollut. Bull.* 64: 1339-1347.

Kumar, S., G. Stecher, K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33: 1870-1874.

Kwiatkowski, L., B. Gaylord, T. Hill, J. Hosfelt, K. J. Kroeker, Y. Nebuchina, A. Ninokawa, A. D. Russell, E. B. Rivest, M. Sesboüé, K. Caldeira. 2016. Nighttime dissolution in a temperate coastal ocean ecosystem increases under acidification. *Nat. Publ. Gr.* 1-9.

Levy, O., P. Kaniewska, S. Alon, E. Eisenberg, S. Karako-Lampert, L. K. Bay, R. Reef, M. Rodriguez-Lanetty, D. J. Miller, O. Hoegh-Guldberg. 2011. Complex Diel Cycles of Gene Expression in Coral-Algal Symbiosis. *Science.* 331: 175-175.

Lewis, M., M. Götting, K. Anttila, M. Kanerva, J. M. Prokkola, E. Seppänen, I. Kolari, M. Nikinmaa. 2016. Different Relationship between hsp70 mRNA and hsp70 Levels in the Heat Shock Response of Two Salmonids with Dissimilar Temperature Preference. *Front. Physiol.* 7: 1-12.

Logan, C. A., G. N. Somero. 2011. Effects of thermal acclimation on transcriptional

responses to acute heat stress in the eurythermal fish *Gillichthys mirabilis* (Cooper). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 300: R1373-R1383.

Logan, C. A., B. A. Buckley. 2015. Transcriptomic responses to environmental temperature in eurythermal and stenothermal fishes. *J. Exp. Biol.* 218: 1915-1924.

Long, Y., L. Li, Q. Li, X. He, Z. Cui. 2012. Transcriptomic characterization of temperature stress responses in larval zebrafish. *PLoS One* 7.

Lorenzi, V., R. L. Earley, M. S. Grober. 2006. Preventing behavioural interactions with a male facilitates sex change in female bluebanded gobies, *Lythrypnus dalli*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 59: 715-722.

Lund, S. G., D. Caissie, R. A. Cunjak, M. M. Vijayan, B. L. Tufts. 2002. The effects of environmental heat stress on heat-shock mRNA and protein expression in Miramichi Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59: 1553-1562.

Madeira, D., L. Narciso, H. N. Cabral, C. Vinagre, M. S. Diniz. 2012. HSP70 production patterns in coastal and estuarine organisms facing increasing temperatures. *J. Sea Res.* 73: 137-147.

Martínez-Flores. 2007. Caracterización de la temperatura superficial del mar y climatología de la Bahía de La Paz, B.C.S., México 21: 81-91.

Martínez-López, A., R. Cervantes-Duarte, A. Reyes-Salinas, J. E. Valdez-Holguín. 2001. Cambio estacional de clorofila a en La Bahía de La Paz, BCS, Mexico. *Hidrobiológica*.

Munday, P. L., J. M. Donelson, J. A. Domingos. 2017. Potential for adaptation to climate change in a coral reef fish. *Glob. Chang. Biol.* 23: 307-317.

Newton, J. R., C. De Santis, D. R. Jerry. 2012. The gene expression response of the catadromous perciform barramundi *Lates calcarifer* to an acute heat stress. *J. Fish Biol.* 81: 81-93.

Nikinmaa, M., B. B. Rees. 2005. Oxygen-dependent gene expression in fishes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288: R1079-R1090.

Nolan, T., J. Huggett, E. Sanchez. 2013. Good practice guide for the application of quantitative PCR (qPCR). LGC. London, U.K. pp 99.

Obeso-Nieblas, M., B. Shirasago, L. Sánchez-Velasco, J. H. Gaviño-Rodríguez. 2004. Hydrographic variability in Bahía De La Paz, B. C. S, Mexico, during the 1997–1998 El Niño. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 51: 689-710.

Olsvik, P. A., T. Kristensen, R. Waagbø, B. O. Rosseland, K. E. Tollefsen, G. Baeverfjord, M. H. G. Berntssen. 2005. mRNA expression of antioxidant enzymes (SOD, CAT and GSH-Px) and lipid peroxidative stress in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to hyperoxic water during smoltification. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 141: 314-323.

Olsvik, P. A., V. Vikeså, K. K. Lie, E. M. Hevrøy. 2013. Transcriptional responses to temperature and low oxygen stress in Atlantic salmon studied with next-generation sequencing technology. *BMC Genomics* 14: 817.

Oren, M., A. M. Tarrant, S. Alon, N. Simon-Blecher, I. Elbaz, L. Appelbaum, O. Levy. 2015. Profiling molecular and behavioral circadian rhythms in the non-symbiotic sea anemone *Nematostella vectensis*. *Sci. Rep.* 5: 11418.

Owczarzy, R., A. V. Tataurov, Y. Wu, J.A. Manthey, K. A. McQuisten, H. G. Almabrazi, K. F. Pedersen, Y. Lin, J. Garretson, N. O. McEntaggart, C. A. Sailor, R. B. Dawson, A. S. Peek. 2008. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Res.* 36: W163-W169.

Patnaik, S. C., D. K. Sahoo, G. B. Chainy. 2013. A Comparative Study of Catalase Activities in Different Vertebrates A Comparative Study of Catalase Activities in Different Vertebrates. *WebmedCentral Zool.* 4: 1-16.

Pfaffl, M.W. 2004. Quantification strategies in real-time PCR, A–Z of Quantitative PCR. Podrabsky, J.E. 2004. Changes in gene expression associated with acclimation to constant temperatures and fluctuating daily temperatures in an annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. *J. Exp. Biol.* 207: 2237-2254.

Pollock, M. S., L. M. J. Clarke, M. G. Dubé. 2007. The effects of hypoxia on fishes: from ecological relevance to physiological effects. *Environ. Rev.* 15: 1-14.

Purushothaman, S., S. Saxena, V. Meghah, M. G. Meena Lakshmi, S. K. Singh, C. V. Brahmendra Swamy, M. M. Idris. 2015. Proteomic and gene expression analysis of zebrafish brain undergoing continuous light/dark stress. *J. Sleep Res.* 24: 458-465.

Reyes-Salinas, A., R. Cervantes-Duarte, R. Morales-Pérez, J. E. Valdez-Holguín. 2003. Variabilidad estacional de la productividad primaria y su relación con la estratificación vertical en la Bahía de la Paz, B. C. S. Hidrobiológica 13: 103-110.

Richards, J. G. 2011. Physiological, behavioral and biochemical adaptations of intertidal fishes to hypoxia. J. Exp. Biol. 214: 191-199.

Rimoldi, S., G. Terova, P. Ceccuzzi, S. Marelli, M. Antonini, M. Saroglia. 2012. HIF-1 α mRNA levels in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) exposed to acute and chronic hypoxia. Mol. Biol. Rep. 39: 4009-4015.

Robertson, D. R., G. R. Allen. 2015. Peces Costeros del Pacífico Oriental Tropical: sistema de Información en línea.

Rummer, J. L., C. S. Couturier, J. A. W. Stecyk, N. M. Gardiner, J. P. Kinch, G. E. Nilsson, P. L. Munday. 2014. Life on the edge: thermal optima for aerobic scope of equatorial reef fishes are close to current day temperatures. Glob. Chang. Biol. 20: 1055-1066.

Rytkönen, K. T., K. A. M. Vuori, C. R. Primmer, M. Nikinmaa. 2007. Comparison of hypoxia-inducible factor-1 alpha in hypoxia-sensitive and hypoxia-tolerant fish species. Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics 2: 177-186.

Silver, J. T., E. G. Noble. 2012. Regulation of survival gene hsp70. Cell Stress Chaperones 17: 1-9.

Smith, M. J., J. Gelsleichter, K. J. Smith. 2012. Protein expression of hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF-1 α) in spot (*Leiostomus xanthurus*) exposed to constant and diel-cycling hypoxia. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 424-425: 1-4.

Somero, G. N. 2002. Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals: Optima, limits, and costs of living. Integr. Comp. Biol. 42: 780-789.

Stewart, B., J. Beukers. 2000. Baited technique improves censuses of cryptic fish in complex habitats. Mar. Ecol. Prog. Ser. 197: 259-272.

Sundararajan, S., B. Kamalakannan, R. Karthikeyan, M. K. Khadanga, B. Kumara Jena. 2018. Diurnal Variation and Water Quality Parameters of Three Different Ecosystems in Gulf of Mannar, Southeast Coast of India. J. Mar. Sci. Res. Dev. 08: 1-6.

- Tavera, J., S. Rojas-Vélez. 2017. Seeing the invisible: *Chriolepis lepidota* (Gobiidae), literally as never seen before. *Mar. Biodivers. Rec.* 10: 1-4.
- Thacker, C. 2011. Systematics of Gobiidae, p. 129-136. *En:* B. G. K. Robert Patzner, J. L. Van Tassell, M. Kovacic (ed.). *The biology of gobies*. Primera Edición. CRC Press. 702 p.
- Thacker, C. E., D. M. Roje. 2011. Phylogeny of Gobiidae and identification of gobiid lineages. *Syst. Biodivers.* 9: 329-347.
- Thomson, D. A., L. T. Findley, A. N. Kerstitch. 2000. Reef Fishes of the Sea of Cortez: The Rocky-Shore Fishes of the Gulf of California, Corrie Herring Hooks Series. University of Texas Press. 353 p.
- Tiedke, J., J. Borner, H. Beeck, M. Kwiatkowski, H. Schmidt, R. Thiel, A. Fabrizius, T. Burmester. 2015. Evaluating the hypoxia response of ruffe and flounder gills by a combined proteome and transcriptome approach. *PLoS One* 10: 1-20.
- Tiedke, J., R. Thiel, T. Burmester. 2014. Molecular response of estuarine fish to hypoxia: A comparative study with ruffe and flounder from field and laboratory. *PLoS One* 9: 1-12.
- Tine, M. 2017. Evidence of the Complexity of Gene Expression Analysis in Fish Wild Populations. *Int. J. Genomics* 2017: 1-14.
- Tomanek, L. 2010. Variation in the heat shock response and its implication for predicting the effect of global climate change on species' biogeographical distribution ranges and metabolic costs. *J. Exp. Biol.* 213: 971-979.
- Tunnah, L., S. Currie, T. J. MacCormack. 2017. Do prior diel thermal cycles influence the physiological response of Atlantic salmon (*Salmo salar*) to subsequent heat stress? *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 74: 127-139.
- Udvardi, M. K., T. Czechowski, W. R. Scheible. 2008. Eleven Golden Rules of Quantitative RT-PCR. *Plant Cell Online* 20: 1736-1737.
- Untergasser, A., I. Cutcutache, T. Koressaar, J. Ye, B. C. Faircloth, M. Remm, S. G. Rozen. 2012. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40: e115-e115.
- Vaquer-Sunyer, R., C. M. Duarte. 2008. Thresholds of hypoxia for marine biodiversity. *Proc.*

Natl. Acad. Sci. 105: 15452-15457.

Veilleux, H. D., T. Ryu, J. M. Donelson, T. Ravasi, P. L. Munday. 2018. Molecular Response to Extreme Summer Temperatures Differs Between Two Genetically Differentiated Populations of a Coral Reef Fish. *Front. Mar. Sci.* 5: 1-12.

Vera, L. M., P. Negrini, C. Zagatti, E. Frigato, F. J. Sánchez-Vázquez, C. Bertolucci. 2013. Light and feeding entrainment of the molecular circadian clock in a marine teleost (*Sparus aurata*). *Chronobiol. Int.* 30: 649-61.

Villegas-Sánchez, C. A., L.A . Abitia-Cárdenas, F. J. Gutiérrez-Sánchez, F. Galván-Magaña. 2009. Rocky-reef fish assemblages at San José Island, Mexico. *Rev. Mex. Biodivers.* 80: 169-179.

Vinueza-Burgos, C. 2009. PCR en Tiempo Real : la nueva era de la información genética celular. *Rev. Electrónica Vet.* 10: 1-13.

Voellmy, R. 2004. On mechanisms that control heat shock transcription factor activity in metazoan cells. *Cell Stress Chaperones* 9: 122.

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

Wenger, A. S., J. Whinney, B. Taylor, F. Kroon. 2016. The impact of individual and combined abiotic factors on daily otolith growth in a coral reef fish. *Sci. Rep.* 6: 1-10.

Willis, T., M. Anderson. 2003. Structure of cryptic reef fish assemblages: relationships with habitat characteristics and predator density. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 257: 209-221.

Woo, S., V. Denis, H. Won, K. Shin, G. Lee, T.-K. Lee, S. Yum. 2013. Expressions of oxidative stress-related genes and antioxidant enzyme activities in *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia, Mollusca) exposed to hypoxia. *Zool. Stud.* 52: 15.

Xiao, W. 2015. The hypoxia signaling pathway and hypoxic adaptation in fishes. *Sci. China Life Sci.* 58: 148-155.

Xu, Y. Q., D. Zhang, T. Jin, D. J. Cai, Q. Wu, Y. Lu, J. Liu, C.D. Klaassen. 2012. Diurnal Variation of Hepatic Antioxidant Gene Expression in Mice. *PLoS One* 7: 3-10.

- Yamashita, M., T. Yabu, N. Ojima. 2010. Stress Protein HSP70 in Fish. *Aqua-BioScience Monogr.* 3: 111-141.
- Yifan, L., M. Daoyuan, X. Zhizhong, X. Shihong, W. Yanfeng, W. Yufu, X. Yongshuang, S. Zongcheng, T. Zhaojun, L. Qinghua, L. Jun. 2015. Histological change and heat shock protein 70 expression in different tissues of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in response to elevated temperature. *Chinese J. Oceanol. Limnol.* 33: 11-19.
- Yousuf, P.Y., K. Ul, R. Hakeem, R. Chandna, P. Ahmad. 2012. Abiotic Stress Responses in Plants, p. 149-158. En: P. Ahmad, M. N. V. Prasad (eds.). *Abiotic Stress Responses in Plants: Metabolism, Productivity and Sustainability*. Springer New York, New York, NY. 473 p.
- Yu, H., W. Deng, D. Zhang, Y. Gao, Z. Yang, X. Shi, J. Sun, J. Zhou, H. Ji. 2017. Antioxidant defenses of *Onychostoma macrolepis* in response to thermal stress: Insight from mRNA expression and activity of superoxide dismutase and catalase. *Fish Shellfish Immunol.* 66: 50-61.
- Yúfera, M., E. Perera, J. A. Mata-Sotres, J. Calduch-Giner, G. Martínez-Rodríguez, J. Pérez-Sánchez. 2017. The circadian transcriptome of marine fish (*Sparus aurata*) larvae reveals highly synchronized biological processes at the whole organism level. *Sci. Rep.* 7: 1-14.
- Zayas-Álvarez, J. A. 2005. Análisis de la estructura comunitaria de los peces crípticos asociados a un arrecife artificial en Punta Diablo, Bahía de La Paz, B.C.S., México. Tesis (Maestría en ciencias). Baja California Sur, México. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. 87 p.
- Zelko, I. N., T. J. Mariani, R. J. Folz. 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic. Biol. Med.* 33: 337-349.
- Zhang, G., J. Mao, F. Liang, J. Chen, C. Zhao, S. Yin, L. Wang, Z. Tang, S. Chen. 2016. Modulated expression and enzymatic activities of Darkbarbel catfish, *Pelteobagrus vachelli* for oxidative stress induced by acute hypoxia and reoxygenation. *Chemosphere* 151: 271-279.

11. ANEXOS

Anexo 1. Abundancia de las especies obtenidas por hora de colecta en Punta Diablo, Bahía de La Paz, Baja California Sur.

Temporada cálida			Temporada fría		
Hora de colecta	n	Especie	Hora de colecta	n	Especie
12:00	37	<i>Acanthemblemaria crockeri</i>	12:00	11	<i>Acanthemblemaria crockeri</i>
	25	<i>Tigrigobius puncticulatus</i>		5	<i>Lythrypnus dalli</i>
	10	<i>Enneanectes reticulatus</i>		3	<i>Lythrypnus pulchellus</i>
	8	<i>Crocodilichthys gracilis</i>		3	<i>Tigrigobius puncticulatus</i>
	4	<i>Barbulifer pantherinus</i>		2	<i>Acanthemblemaria macrospilus</i>
	3	<i>Lythrypnus pulchellus</i>		1	<i>Crocodilichthys gracilis</i>
	2	<i>Lythrypnus dalli</i>		1	<i>Apogon retrosella</i>
	1	<i>Apogon retrosella</i>		1	<i>Tigrigobius digueti</i>
16:00	50	<i>Acanthemblemaria crockeri</i>	16:00	20	<i>Acanthemblemaria crockeri</i>
	14	<i>Tigrigobius puncticulatus</i>		11	<i>Tigrigobius puncticulatus</i>
	12	<i>Coryphopterus urospilus</i>		7	<i>Lythrypnus dalli</i>
	11	<i>Lythrypnus dalli</i>		5	<i>Lythrypnus pulchellus</i>
	8	<i>Crocodilichthys gracilis</i>		3	<i>Crocodilichthys gracilis</i>
	6	<i>Enneanectes reticulatus</i>		3	<i>Barbulifer pantherinus</i>
	6	<i>Lythrypnus pulchellus</i>		1	<i>Acanthemblemaria macrospilus</i>
	4	<i>Barbulifer pantherinus</i>			
2	<i>Apogon retrosella</i>				
20:00	16	<i>Acanthemblemaria crockeri</i>	20:00	10	<i>Acanthemblemaria crockeri</i>
	9	<i>Tigrigobius puncticulatus</i>		9	<i>Tigrigobius puncticulatus</i>
	5	<i>Enneanectes reticulatus</i>		8	<i>Lythrypnus pulchellus</i>
	2	<i>Barbulifer pantherinus</i>		7	<i>Barbulifer pantherinus</i>
	2	<i>Crocodilichthys gracilis</i>		6	<i>Lythrypnus dalli</i>
	2	<i>Protoblemaria bicirrus</i>		2	<i>Coryphopterus urospilus</i>
	1	<i>Lythrypnus pulchellus</i>		2	<i>Tigrigobius digueti</i>
				1	<i>Acanthemblemaria macrospilus</i>
0:00	14	<i>Crocodilichthys gracilis</i>	0:00	10	<i>Lythrypnus pulchellus</i>
	7	<i>Enneanectes reticulatus</i>		7	<i>Tigrigobius puncticulatus</i>
	6	<i>Tigrigobius puncticulatus</i>		5	<i>Lythrypnus dalli</i>
	5	<i>Acanthemblemaria crockeri</i>		3	<i>Acanthemblemaria crockeri</i>
	5	<i>Lythrypnus dalli</i>		1	<i>Coryphopterus urospilus</i>

	4	<i>Lythrypnus pulchellus</i>		1	<i>Barbulifer pantherinus</i>
	2	<i>Apogon retrosella</i>		1	<i>Malacoctenus hubbsi</i>
	1	<i>Barbulifer pantherinus</i>		1	<i>Starksia spinipenis</i>
	1	<i>Ogilbia ventralis</i>			
	19	<i>Tigrigobius puncticulatus</i>		6	<i>Lythrypnus pulchellus</i>
	17	<i>Acanthemblemaria crockeri</i>		5	<i>Lythrypnus dalli</i>
	5	<i>Apogon retrosella</i>		4	<i>Tigrigobius puncticulatus</i>
4:00	5	<i>Enneanectes reticulatus</i>	4:00	3	<i>Acanthemblemaria crockeri</i>
	2	<i>Crocodilichthys gracilis</i>		3	<i>Barbulifer pantherinus</i>
	2	<i>Lythrypnus pulchellus</i>		3	<i>Coryphopterus urospilus</i>
	1	<i>Axoclinus nigricaudus</i>		2	<i>Apogon retrosella</i>
	1	<i>Barbulifer pantherinus</i>		1	<i>Crocodilichthys gracilis</i>
	59	<i>Acanthemblemaria crockeri</i>		11	<i>Lythrypnus pulchellus</i>
	15	<i>Enneanectes reticulatus</i>		10	<i>Acanthemblemaria crockeri</i>
	13	<i>Tigrigobius puncticulatus</i>		9	<i>Lythrypnus dalli</i>
	11	<i>Coryphopterus urospilus</i>		6	<i>Coryphopterus urospilus</i>
8:00	7	<i>Lythrypnus dalli</i>	8:00	4	<i>Tigrigobius puncticulatus</i>
	6	<i>Crocodilichthys gracilis</i>		4	<i>Tigrigobius digueti</i>
	6	<i>Lythrypnus pulchellus</i>		3	<i>Barbulifer pantherinus</i>
	3	<i>Apogon retrosella</i>		3	<i>Crocodilichthys gracilis</i>
	2	<i>Tigrigobius digueti</i>		2	<i>Apogon retrosella</i>
	1	<i>Barbulifer pantherinus</i>		1	<i>Enneanectes reticulatus</i>

Anexo 2. Resultados de la extracción del ARN total de individuos de *Lythrypnus dalli* de Punta Diablo, La Paz, Baja California Sur.

Temporada	Hora	Muestra	Concentración (ng μL^{-1})	Concentración (Limpio)	A260	A280	Abs 260/280	Abs 260/230	Peso g	Vol. Final	Rendimiento (ng mg^{-1} tejido)
Temporada cálida	12:48	L1a	1.178,3	235,9	29,457	15,029	1,96	1,99	0,066	20	357,06
	12:48	L2a	1.148,1	405,0	28,704	14,600	1,97	1,97	0,065	20	353,26
	16:48	L1b	2.124,9	711,5	53,123	25,786	2,06	1,91	0,091	20	467,01
	16:48	L2b	1.957,4	890,6	48,935	23,737	2,06	1,84	0,095	20	412,08
	16:48	L3b	1.895,1	557,3	47,378	23,388	2,03	1,82	0,145	20	261,39
	16:48	L4b	2.067,5	576,9	51,688	25,277	2,05	1,53	0,11	20	375,91
	16:48	L5b	1.695,8	375,1	42,394	20,975	2,02	1,72	0,093	20	364,69
	0:48	L1d	1.498,4	742,0	37,459	18,207	2,06	1,69	0,19	20	157,73
	0:48	L2d	2.286,3	605,5	57,157	28,198	2,03	1,93	0,138	20	331,35
	0:48	L3d	970,4	631,5	24,261	12,477	1,94	1,94	0,083	20	233,83
	0:48	L4d	2.487,2	1.297,9	62,181	30,659	2,03	1,86	0,163	20	305,18
	0:48	L5d	2.398,6	577,3	59,966	30,088	1,99	1,95	0,11	20	436,11
	8:48	L1f	2.300,7	833,2	57,518	28,727	2,00	2,10	0,063	20	730,38
	8:48	L2f	3.299,1	996,5	82,477	40,765	2,02	1,84	0,091	20	725,08
	8:48	L3f	1.348,3	610,6	33,707	16,864	2,00	1,85	0,078	20	345,72
8:48	L4f	2.173,2	943,5	54,330	26,349	2,06	1,93	0,123	20	353,37	
8:48	L5f	1.372,7	867,5	34,317	16,858	2,04	1,87	0,113	20	242,96	
Temporada fría	12:00	LA1	1.085,0	502,7	27,126	13,610	1,99	2,07	0,031	20	700,00
	12:00	LA2	1.309,6	573,2	32,741	16,090	2,03	2,08	0,044	20	595,27
	12:00	LA3	4.119,8	1.701,1	102,994	50,257	2,05	1,98	0,227	20	362,98
	12:00	LA4	1.524,8	686,6	38,120	18,941	2,01	1,62	0,126	20	242,03
	12:00	LA5	2.392,0	2.269,8	59,801	28,911	2,07	2,09	0,202	40	473,66
	16:00	LB1	2.083,1	750,9	52,078	25,097	2,08	1,90	0,113	20	216,99
	16:00	LB2	3.879,7	1.647,7	96,992	46,998	2,06	2,08	0,192	20	404,14
	16:00	LB3	4.625,7	1.526,6	115,644	56,193	2,06	1,86	0,144	20	642,46
	16:00	LB4	2.523,1	1.291,7	63,078	30,264	2,08	1,75	0,144	20	350,43
	16:00	LB5	2.471,1	852,9	61,776	30,391	2,03	1,65	0,193	20	256,07
	20:00	LC1	2.044,8	592,6	51,119	25,082	2,04	1,82	0,123	20	332,49
	20:00	LC2	1.241,4	730,1	31,034	15,054	2,06	1,99	0,101	20	369,35
	20:00	LC3	1.865,2	943,1	46,631	22,591	2,06	2,07	0,077	20	368,03

Continuación Anexo 2

Temporada fría	20:00	LC4	1.416,9	866,4	35,422	17,302	2,05	1,89	0,116	20	282,79
	20:00	LC5	1.640,2	430,9	41,004	19,945	2,06	1,95	0,119	20	275,66
	0:00	LD1	1.250,8	108,5	31,270	15,175	2,06	1,88	0,114	20	219,44
	0:00	LD2	2.069,8	1.499,5	51,746	25,150	2,06	1,80	0,159	20	260,35
	0:00	LD3	3.685,1	2.358,5	92,127	44,433	2,07	1,84	0,261	20	282,38
	0:00	LD4	2.941,7	2.663,3	73,543	35,553	2,07	1,65	0,212	20	277,52
	0:00	LD5	2.809,3	2.247,5	70,231	33,544	2,09	1,93	0,174	20	322,91
	4:00	LE1	1.842,9	902,4	46,073	21,764	2,12	1,97	0,128	20	287,95
	4:00	LE2	3.808,4	1.847,5	95,210	45,417	2,10	1,93	0,162	20	470,17
	4:00	LE3	1.216,3	724,9	30,408	14,458	2,10	2,16	0,021	20	1158,38
	4:00	LE4	1.199,6	589,4	29,989	14,237	2,11	1,97	0,094	20	255,23
	4:00	LE5	689,0	347,1	17,226	8,909	1,93	2,36	0,148	20	93,11
	8:00	LF1	3.295,6	1.094,2	82,391	39,513	2,09	1,99	0,116	20	568,21
	8:00	LF2	2.289,2	1.190,6	57,230	27,882	2,05	1,86	0,075	20	610,45
	8:00	LF3	2.529,7	1.543,1	63,242	30,413	2,08	1,90	0,108	20	468,46
8:00	LF4	2.684,0	1.489,6	67,099	32,230	2,08	1,94	0,078	20	688,21	
8:00	LF5	4.150,7	3.894,1	103,768	49,883	2,08	2,08	0,208	20	399,11	

El rendimiento se calculó multiplicando la concentración de la muestra ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) por el volumen final (20 μL) y se dividió entre el peso de cada muestra de la cual se extrajo el ARN.

Anexo 3. Secuencias obtenidas de GenBank (NCBI) utilizadas el diseño de los oligonucleótidos.

Gen	No. acceso	Nombre	Tamaño (pb)
hsp70	HM348777.1	Acipenser baerii heat shock protein 70 mRNA complete cds	2343
	XM_023268738.1	PREDICTED: Amphiprion ocellaris heat shock protein family A (Hsp70) member 4 (hsps4), mRNA	2852
	DQ872649.1	Carassius auratus HSC70 mRNA, partial cds	1001
	KF417515.1	Carassius gibelio heat shock cognate 70 kDa protein mRNA, partial cds	759
	XM_0154 02100.1	PREDICTED: Cyprinodon variegatus heat shock protein family A (Hsp70) member 8 (hsps8), mRNA	2239
	KP050541.1	Huso dauricus heat shock protein 70 (HSP70) mRNA, complete cds	2275
	EF055884.1	Neoceratodus forsteri heat shock protein 70 mRNA, partial cds	654
	XM_024262254.1	PREDICTED: Oryzias melastigma heat shock 70 kDa protein 1 (LOC112139445), transcript variant X2, mRNA	2541
	EF408831.1	Poecilia reticulata heat shock protein hsp70 mRNA, partial cds	1307
	JX854453.1	Procypris rabaudi heat shock cognate protein 70 (hsc70) mRNA, partial cds	1043
	EF191027.1	Psetta maxima heat shock cognate protein 70 (hsc70) mRNA, complete cds	2188
	LN864699.1	Salaria pavo partial mRNA for heat shock protein 70 (HSP70 gene)	488
hif1α	DY708816.1	EST_ssal_rgb2_64555 ssalrgb2 mixed_tissue Salmo salar cDNA Salmo salar cDNA clone ssal_rgb2_604_065_rev 5-, mRNA sequence	812
	XM_008283987.1	PREDICTED: Stegastes partitus hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor) (hif1a), mRNA	2377
	XM_008400026.2	PREDICTED: Poecilia reticulata hypoxia inducible factor 1 alpha subunit (hif1a), mRNA	3871
	XM_05723967.1	PREDICTED: Pundamilia nyererei hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor) (hif1a), mRNA	3667
	XM_014987877.1	PREDICTED: Poecilia mexicana hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor) (hif1a), mRNA	3850
	XM_015021239.1	PREDICTED: Poecilia latipinna hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor) (hif1a), mRNA	907
	KY415998.1	Oreochromis niloticus hypoxia inducible factor 1 alpha subunit (hif1a) mRNA, complete cds	2686
	DQ317443.1	Oryzias melastigma hypoxia-inducible factor 1 alpha mRNA, complete cds	3454
	XM_015970033.1	PREDICTED: Nothobranchius furzeri hypoxia inducible factor 1 alpha subunit (hif1a), mRNA	4275
	XM_012922331.3	PREDICTED: Maylandia zebra hypoxia inducible factor 1 alpha subunit (hif1a), transcript variant X2, mRNA	3657
	XM_014331924.1	PREDICTED: Haplochromis burtoni hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor) (hif1a), mRNA	3639
	EF100705.1	Gymnocephalus cernuus hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1a) mRNA, complete cds	2247
	XM_012864517.2	PREDICTED: Fundulus heteroclitus hypoxia inducible factor 1 alpha subunit (hif1a), mRNA	3531

Continuación Anexo 3

	KR703590.1	Fundulus grandis hypoxia inducible factor 1 alpha*1 mRNA, complete cds	2477
	KC110757.1	Etroplus suratensis hypoxia inducible factor alpha 1 (Hif1) mRNA, partial cds	1785
	XM_015379226.1	PREDICTED: Cyprinodon variegatus hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor) (hif1a), mRNA	3780
	XM_022221672.1	PREDICTED: Acanthochromis polyacanthus hypoxia inducible factor 1 alpha subunit (hif1a), mRNA	3536
	XM_023285910.1	PREDICTED: Amphiprion ocellaris hypoxia inducible factor 1 alpha subunit (hif1a), mRNA	3538
mn-sod	LN864694.1	Salaria pavo partial mRNA for manganese superoxide dismutase (MnSOD gene)	150
	XM_020927607.1	PREDICTED: Boleophthalmus pectinirostris superoxide dismutase 2 (sod2), mRNA	1366
	KU845215.1	Odontobutis potamophila manganese superoxide dismutase mRNA, complete cds	1008
	XM_014009996.1	PREDICTED: Austrofundulus limnaeus superoxide dismutase 2, mitochondrial (sod2), mRNA	1019
	XM_015369612.1	PREDICTED: Cyprinodon variegatus superoxide dismutase 2, mitochondrial (sod2), mRNA	997
	AY735007.1	Epinephelus coioides manganese superoxide dismutase (MnSOD) mRNA, complete cds	1211
	XM_012867409.2	PREDICTED: Fundulus heteroclitus superoxide dismutase 2 (sod2), mRNA	1185
	MF066224.1	Hippocampus abdominalis manganese superoxide dismutase (SOD) mRNA, complete cds	1021
	XM_005921632.2	PREDICTED: Haplochromis burtoni superoxide dismutase 2, mitochondrial (sod2), mRNA	1252
	NM_001303364.1	Larimichthys crocea superoxide dismutase 2 (sod2), mRNA	678
	KX171656.1	Lutjanus peru manganese superoxide dismutase (MnSOD) mRNA, complete cds	1185
	XM_004568790.4	PREDICTED: Maylandia zebra superoxide dismutase 2 (sod2), mRNA	1222
	XM_006792498.1	PREDICTED: Neolamprologus brichardi superoxide dismutase [Mn], mitochondrial-like (LOC102787761), mRNA	1238
	XM_010772932.1	PREDICTED: Notothenia coriiceps superoxide dismutase 2, mitochondrial (sod2), mRNA	1283
	JN593103.1	Oplegnathus fasciatus manganese superoxide dismutase mRNA, complete cds	1198
	XM_004083471.4	PREDICTED: Oryzias latipes superoxide dismutase 2 (sod2), mRNA	1203
	JF801727.1	Oreochromis niloticus superoxide dismutase mRNA, partial cds	386
	XM_007546782.2	PREDICTED: Poecilia formosa superoxide dismutase 2, mitochondrial (sod2), mRNA	960
	XM_015017636.1	PREDICTED: Poecilia latipinna superoxide dismutase 2, mitochondrial (sod2), mRNA	1217
	XM_014971825.1	PREDICTED: Poecilia mexicana superoxide dismutase 2, mitochondrial (sod2), mRNA	1225
	XM_005731008.2	PREDICTED: Pundamilia nyererei superoxide dismutase 2, mitochondrial (sod2), mRNA	1230
	AB604157.1	Paralichthys olivaceus SOD2 mRNA for Mn-superoxide dismutase, complete cds	1205
	DQ350776.2	Rachycentron canadum manganese superoxide dismutase (SOD2) mRNA, complete cds	678
	JQ308833.1	Sparus aurata Mn superoxide dismutase (Mn-SOD) mRNA, complete cds	1021
	KJ578919.1	Siniperca chuatsi mitochondrial manganese superoxide dismutase mRNA, complete cds; nuclear gene for mitochondrial product	1233
	XM_022737832.1	PREDICTED: Seriola dumerili superoxide dismutase 2 (sod2), mRNA	1237

Continuación Anexo 3

	XM_023400443.1	PREDICTED: <i>Seriola lalandi dorsalis</i> superoxide dismutase 2 (<i>sod2</i>), transcript variant X2, mRNA	1217	
	KY689033.1	<i>Totoaba macdonaldi</i> mitochondrial manganese superoxide dismutase (<i>MnSOD</i>) mRNA, complete cds; nuclear gene for mitochondrial product	1179	
	CR719438.2	<i>Tetraodon nigroviridis</i> full-length cDNA	1047	
	XM_005802615.2	PREDICTED: <i>Xiphophorus maculatus</i> superoxide dismutase 2 (<i>sod2</i>), mRNA	1230	
clock	XM_020918704.1	PREDICTED: <i>Boleophthalmus pectinirostris</i> clock circadian regulator (<i>clock</i>), mRNA	3041	
	XM_012820282.1	PREDICTED: <i>Clupea harengus</i> neuronal PAS domain-containing protein 2-like (LOC105893786), mRNA	3536	
	XM_015379683.1	PREDICTED: <i>Cyprinodon variegatus</i> neuronal PAS domain-containing protein 2-like (LOC107087869), transcript variant X2, mRNA	4569	
	NM_130957.1	<i>Danio rerio</i> clock circadian regulator a (<i>clocka</i>), mRNA	2682	
	XM_012855378.2	PREDICTED: <i>Fundulus heteroclitus</i> clock circadian regulator (<i>clock</i>), transcript variant X1, mRNA	3934	
	HM161713.1	<i>Gadus morhua</i> clock protein mRNA, partial cds	783	
	JX035866.1	<i>Gadus morhua</i> neuronal PAS domain-containing protein 2 (<i>npas2</i>) mRNA, partial cds	516	
	NM_001286316.1	<i>Haplochromis burtoni</i> clock circadian regulator (<i>clock</i>), mRNA	2595	
	XM_017459490.1	PREDICTED: <i>Ictalurus punctatus</i> neuronal PAS domain-containing protein 2-like (LOC108259764), mRNA	4686	
	XM_017435553.2	PREDICTED: <i>Kryptolebias marmoratus</i> neuronal PAS domain-containing protein 2-like (LOC108247432), mRNA	9977	
	XM_020643795.1	PREDICTED: <i>Labrus bergylta</i> clock circadian regulator (<i>clock</i>), transcript variant X6, mRNA	4163	
	XM_010780022.1	PREDICTED: <i>Notothenia coriiceps</i> neuronal PAS domain-containing protein 2-like (LOC104953098), mRNA	2019	
	XM_024265750.1	PREDICTED: <i>Oryzias melastigma</i> neuronal PAS domain-containing protein 2-like (LOC112142414), transcript variant X1, mRNA	6086	
	XM_007545985.2	PREDICTED: <i>Poecilia formosa</i> neuronal PAS domain-containing protein 2-like (LOC103133964), transcript variant X1, mRNA	3277	
	XM_023795808.1	PREDICTED: <i>Paramormyrops kingsleyae</i> circadian locomoter output cycles protein kaput-like (LOC111835464), transcript variant X1, mRNA	3989	
	XM_014996827.1	PREDICTED: <i>Poecilia mexicana</i> neuronal PAS domain-containing protein 2-like (LOC106923633), transcript variant X1, mRNA	3148	
	XM_017721884.1	PREDICTED: <i>Pygocentrus nattereri</i> circadian locomoter output cycles protein kaput-like (LOC108442046), transcript variant X1, mRNA	3990	
		KF742501.1	<i>Pelteobagrus vachellii</i> clock mRNA, partial cds	933
		JQ965015.1	<i>Sparus aurata</i> CLOCK (Clock) mRNA, partial cds	728
		AF448805.1	<i>Sebastes schlegeli</i> Clock (CLOCK) gene, partial cds	2919

Continuación Anexo 3

cry1	HADX01003905.1	TSA: <i>Aphyosemion striatum</i> partial mRNA for cryptochrome 2a (CRY2A gene), contig APS_c11752_g1_i2, transcribed RNA sequence	907
	LC030228.1	<i>Chrysiptera cyanea</i> cry2 mRNA for cryptochrome2, complete cds	2022
	JX046478.1	<i>Dicentrarchus labrax</i> cryptochrome 2 mRNA, complete cds	2515
	HAEI01006741.1	TSA: <i>Nothobranchius rachovii</i> mRNA for cryptochrome 2a (CRY2A gene), contig NRA_c15671_g2_i2, transcribed RNA sequence	4504
	KP7002273.1	<i>Siniperca chuatsi</i> cryptochrome 2 mRNA, partial cds	1182
per2	XM_006786483.1	PREDICTED: <i>Neolamprologus brichardi</i> period circadian protein homolog 2-like (LOC102798599), transcript variant X1, mRNA	5134
	XM_005476307.3	PREDICTED: <i>Oreochromis niloticus</i> period circadian protein homolog 2 (LOC100689707), transcript variant X1, mRNA	6394
	XM_008294504.1	PREDICTED: <i>Stegastes partitus</i> period circadian protein homolog 2-like (LOC103366709), transcript variant X1, mRNA	6824
	XM_015371465.1	PREDICTED: <i>Cyprinodon variegatus</i> period circadian clock 2 (per2), mRNA	6788
	XM_005926606.2	PREDICTED: <i>Haplochromis burtoni</i> period circadian clock 2 (per2), mRNA	6606
	KF956109.1	<i>Kryptolebias marmoratus</i> period 2 (PER2) mRNA, partial cds	3030
	XM_014409514.3	PREDICTED: <i>Maylandia zebra</i> period circadian regulator 2 (per2), mRNA	7531
	XM_020708536.2	PREDICTED: <i>Oryzias latipes</i> period circadian regulator 2 (per2), transcript variant X2, mRNA	6825
	XM_005738369.2	PREDICTED: <i>Pundamilia nyererei</i> period circadian clock 2 (per2), mRNA	7196
	XM_008426232.1	PREDICTED: <i>Poecilia reticulata</i> period circadian clock 2 (per2), mRNA	6915
XM_014475891.2	PREDICTED: <i>Xiphophorus maculatus</i> period circadian regulator 2 (per2), mRNA	6826	
β-actina	EF555077.1	<i>Atherina boyeri</i> beta actin mRNA, partial cds	929
	XM_020927288.1	PREDICTED: <i>Boleophthalmus pectinirostris</i> actin beta (actb), transcript variant X1, mRNA	1880
	JF946754.1	<i>Bostrychus sinensis</i> beta-actin mRNA, partial cds	710
	EU158257.1	<i>Cichlasoma dimerus</i> beta actin mRNA, partial cds	456
	EF555088.1	<i>Liza aurata</i> beta actin mRNA, partial cds	929
	JX298095.1	<i>Mugilogobius abei</i> beta-actin mRNA, partial cds	579
	NM_001104808.1	<i>Oryzias latipes</i> cytoplasmic actin OICA1 (actb), mRNA	1840
	Y18689.1	<i>Oreochromis mossambicus</i> mRNA for actin, partial	549
	LN864686.1	<i>Salaria pavo</i> partial mRNA for actine beta (actb gene)	191
	NM_001297475.1	<i>Poecilia reticulata</i> actin, beta (actb), mRNA	1866
	EF640653.1	<i>Pomatoschistus</i> sp. B02 beta actin mRNA, partial cds	930

Anexo 4. Perfiles electroforéticos en gel de agarosa/Synergel 1% en TBE-DEPC del ARN total obtenido de todas las muestras de *Lythrypnus dalli*.

