



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

EFEECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA EXPRESIÓN  
DIFERENCIAL DE LOS GENES INVOLUCRADOS EN EL EJE  
HIPOTÁLAMO- PITUITARIO- TIROIDES EN LARVAS DE  
*JUREL Seriola rivoliana*.

## T E S I S

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

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

P r e s e n t a

**Lidda Mariam Calixto Heredia**

La Paz, Baja California Sur, octubre de 2019

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12:00 horas del día 17 del Mes de Octubre 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:

**"EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LOS GENES INVOLUCRADOS EN EL EJE HIPOTÁLAMO-PITUITARIA-TIROIDES EN LARVAS DE JUREL *Seriola rivoliana*"**

Presentada por el alumno:

**Lidda Mariam Calixto Heredia**

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

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



Danitzla Adriana Guerrero Tortolero  
Director de Tesis



Rafael Campos Ramos  
Co-Tutor



Alejandro Manuel Maeda Martínez  
Co-Tutor



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,  
Directora de Estudios de Posgrado y  
Formación de Recursos Humanos

### **Comité Tutorial**

Dra. Danitzia Adriana Guerrero Tortolero  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.  
Directora de Tesis

Dr. Rafael Campos Ramos  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.  
Co-Tutor de Tesis

Dr. Alejandro Manuel Maeda Martínez  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.  
Co-Tutor

### **Comité Revisor de Tesis**

Dra. Danitzia Adriana Guerrero Tortolero  
Dr. Rafael Campos Ramos  
Dr. Alejandro Manuel Maeda Martínez

### **Jurado de Examen**

Dra. Danitzia Adriana Guerrero Tortolero  
Dr. Rafael Campos Ramos  
Dr. Alejandro Manuel Maeda Martínez

### **Suplentes**

Dr. Pedro E. Saucedo Lastra

## Resumen

El eje hipotálamo-pituitario-tiroideo se encuentra conservado en los vertebrados. Las hormonas tiroideas están involucradas en procesos biológicos como el metabolismo, crecimiento, desarrollo, reproducción, metamorfosis, respiración, comportamiento migratorio, adaptación, actividad del sistema nervioso central y maduración neuronal, entre otros. En los peces, las hormonas tiroideas son relevantes en las primeras etapas de desarrollo, como la organogénesis y el desarrollo de sistemas. El eje tiroideo comienza con una estimulación del cerebro y por consiguiente el hipotálamo, a través de señales externas e internas. Estos estímulos conducen al hipotálamo a secretar la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) y esta a su vez estimulará a las células tirotróficas en la glándula pituitaria, para secretar la hormona estimulante de la tiroides (TSH). La TSH actúa sobre los tirocitos para estimular la liberación de la tiroglobulina que se encuentra en los folículos tiroideos y al combinarse con el yodo extracelular y el aminoácido tirosina, a través de las enzimas deiodinasas, se forman las hormonas tiroxina (T4), triyodotironina (T3) y diyodotironina (T2). Estas hormonas se unen a receptores específicos nucleares para realizar la transcripción y actuar directamente en genes específicos, para aumentar o disminuir la expresión de cada gen y provocar una respuesta celular. El objetivo general de este estudio fue evaluar el efecto de la temperatura sobre la expresión diferencial de los genes involucrados en la función tiroidea en los primeros dos días de desarrollo larval de jurel *Seriola rivoliana*. De un ensamble *de novo* (RNA-seq), se identificaron *in silico* y se obtuvieron las secuencias nucleotídicas de los transcritos de la hormona liberadora de tirotrópina (*trh*) (hipotálamo), la hormona estimulante de la tiroides (*tsh*) (pituitaria), la tiroglobulina (*tg*) (folículos tiroideos), receptor tiroideo alfa (*thra*) y beta (*thrb*), y las enzimas deiodinasa1 (*dio1*), deiodinasa 2 (*dio2*) y deiodinasa 3 (*dio3*). La expresión diferencial de *trh* no estuvo influenciada por un incremento de la temperatura ( $P > 0.05$ ), pero sí por la edad de las larvas (día 2 vs día 1) ( $P < 0.05$ ), con una interacción significativa ( $P < 0.05$ ), mientras que *tsh* fue influenciada solo por temperatura ( $P < 0.05$ ), con una mayor expresión a 26 y 28 °C. En el caso de *tg* se obtuvo una expresión muy baja influenciada por temperatura, por día e interacción ( $P < 0.05$ ), mostrando una mayor expresión a 28 °C en el día 1 y a 26 y 28 °C al día 2. Las deiodinasas *dio1* y *dio2* y los receptores alfa (*thra*) y beta (*thrb*), no presentaron efectos por temperatura ni por día ( $P > 0.05$ ). La expresión en la mayoría de los genes ocurrió a partir del día uno post-eclosión. Preliminarmente, se sugiere que la expresión de tiroglobulina, la cual depende de la cascada del eje hipotálamo (*trh*) y pituitaria (*tsh*) estuvo influenciada tanto por la temperatura así como por la edad y quizás por la condición fisiológica de la larva, en donde pudiera estar relacionada con la supervivencia en los primeros días de desarrollo larvario.

Palabras Clave: Tiroxina; hormonas tiroideas; Tiroglobulina; Receptores; *Seriola*

Vo. Bo.



---

Dra. Danitzia A. Guerrero Tortolero  
Directora de Tesis

## Summary

The hypothalamic-pituitary-thyroid axis has been conserved in vertebrates. Thyroid hormones are involved in biological processes such as metabolism, growth, development, reproduction, metamorphosis, respiration, migratory behavior, adaptation, activity of the central nervous system and neuronal maturation, among others. In fish, thyroid hormones are relevant in the early stages of development, such as organogenesis and system development. The thyroid axis begins with a stimulation of the brain and therefore the hypothalamus, through external and internal signals. These stimuli lead the hypothalamus to secrete the thyrotropin-releasing hormone (TRH) and this, in turn, will send a stimulation to the thyrotrophic cells in the pituitary gland, so that they secrete the thyroid-stimulating hormone (TSH). TSH acts on thyrocytes to stimulate the release of thyroglobulin found in thyroid follicles and when combined with extracellular iodine and the amino acid tyrosine, through the enzymes deiodinases, synthesize the hormones thyroxine (T4), triiodothyronine, (T3) and diiodothyronine (T2). These hormones bind to specific nuclear receptors to perform transcription and act directly on specific genes, to increase or decrease the expression of each gene and cause a cellular response. The general objective of this study was to evaluate the effect of temperature on the differential expression of genes involved in thyroid function in the first two days of larval development of longfin yellowtail *Seriola rivoliana*. From a de novo assembly (RNA-seq), genes were identified *in silico* and the nucleotide sequences transcripts were obtained in the thyrotropin releasing hormone (*trh*) (hypothalamus), thyroid stimulating hormone (*tsh*) (pituitary), thyroglobulin (*tg*) (thyroid follicles), thyroid receptor alpha (*thra*) and beta (*thrb*), and the enzymes deiodinase1 (*dio1*), deiodinase 2 (*dio2*) and deiodinase 3 (*dio3*). The differential expression of *trh* was not influenced by an increase in temperature ( $P > 0.05$ ), but it did by the age of the larvae (day 2 vs day 1) ( $P < 0.05$ ), with a significant interaction ( $P < 0.05$ ), while *tsh* was influenced only by temperature ( $P < 0.05$ ), with a higher expression at 26 and 28 °C. In the case of *tg*, a very low expression occurred that was influenced by temperature, age (day) and their interaction ( $P < 0.05$ ), showing a greater expression at 28 °C on day 1 and at 26 and 28 °C on day 2. The diiodinases *dio1* and *dio2* and the alpha (*thra*) and beta (*thrb*) receptors were not affected by temperature or age (day) ( $P > 0.05$ ). The expression in most of the genes occurred from day one post-hatching. Preliminarily, it is suggested that the expression of thyroglobulin (*tg*), which depends on the hypothalamus (*trh*) and pituitary (*tsh*) axis cascade was influenced by both temperature as well as age, and perhaps the physiological condition of the larva, where it could be related to survival in the first days of larval development.

Keywords: Thyroxine; Thyroid hormones; Thyroglobulin; Receptors; *Seriola*

**Vo. Bo.**



---

Dra. Danitzia A. Guerrero Tortolero  
Directora de Tesis

## Dedicatoria

*A Dios*

Por permitirme seguir siempre adelante

*A mi padre Antonio Calixto M. y a mi madre Dora Elsa Heredia L.*

Por ser mi inspiración y fuerza para luchar en alcanzar todas mis metas

*A mis hermanos Priscila y Assiel*

Por qué sé que siempre cuento con su apoyo y cariño



## **Agradecimientos**

Quiero agradecer al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C., como Institución receptora de mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para mis estudios de maestría, con número de becario 854705.

A todos en la Dirección de Posgrado del CIBNOR y el equipo de trabajo, por el apoyo otorgado durante mis estudios de maestría.

A la Dra. Danitzia A. Guerrero del Laboratorio de Endocrinología por su dirección, asesoría y constante apoyo en mis estudios de maestría en el CIBNOR.

Igualmente, a mi comité tutorial: Dr. Rafael Campos y Dr. Alejandro Maeda por todas sus atenciones, tiempo y consejos a lo largo de mis estudios.

A la empresa Kampachi Farms en su planta piloto de reproducción de jurel en el CIBNOR.

A todo el equipo de trabajo y compañeros de laboratorio de Endocrinología: Al Dr. Edgar R. Esquivel por todo su apoyo académico. A Gilberto Colado por la asistencia técnica. A Daniel, Nairobi, Jesús, Felipe gracias por su amistad y hacer de mis horas de trabajo más amenas

A la Dra. Grecia Vázquez Islas por todo el apoyo y tiempo brindado, gracias también por todo su conocimiento y consejos, aún a larga distancia; así también como a su esposo, el Ing. Luis Socorro, por las clases y orientación sobre el uso de R.

A mis compañeros de generación de Maestría, en especial a mis amigos Alejandra Quintero, Lucero Cervantes, Fernanda Ochoa y Yoshio Shiba por su amistad, apoyo y momentos inolvidables.

A mi novio Martin Páez M. por ayudarme y darme ánimos en mis días estresantes

Este estudio fue apoyado por el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) bajo el proyecto de Ciencia Básica CONACyT 258504 otorgado al Dr. Rafael Campos.

## Contenido

<b>Resumen</b> .....	i
<b>Summary</b> .....	iii
<b>Dedicatoria</b> .....	v
<b>Agradecimientos</b> .....	vi
<b>Contenido</b> .....	viii
<b>Lista de Figuras</b> .....	xi
<b>Lista de Tablas</b> .....	xiv
<b>Abreviaturas</b> .....	xv
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Hormonas tiroideas.....	1
1.2 Eje Hipotálamo- pituitario- tiroides.....	1
1.3 Regulación de las hormonas tiroideas.....	5
1.4 Receptores de hormonas tiroideas.....	6
1.5 Efecto de la temperatura en las hormonas tiroideas.....	9
1.6 Elementos traza relacionados con la síntesis de la hormona tiroidea.....	10
1.7 Selenio.....	11
1.8 Yodo.....	11
1.9 Vitaminas.....	12
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	13
2.1 Expresión diferencial de genes.....	13
2.2 Estudios de hormonas tiroideas en peces.....	14
2.3 Efecto de factores ambientales en la piscicultura.....	17
2.4 Efecto de la temperatura en el desarrollo larvario de peces.....	17
2.6 Desarrollo larvario en peces.....	18
2.7 Características morfológicas de jurel <i>Seriola rivoliana</i> .....	19
<b>3. JUSTIFICACION</b> .....	22
<b>4. HIPOTESIS</b> .....	24
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	25
5.1 Objetivo general.....	25
5.2 Objetivos particulares.....	25

<b>6. MATERIAL Y METODOS</b> .....	26
6.1 Huevos de jurel <i>Seriola rivoliana</i> .....	26
6.2 Extracción de ARN .....	26
6.3 Tratamiento con DNasa.....	27
6.4 Cuantificación e integridad del ARN .....	27
6.5 Construcción de las bibliotecas y secuenciación.....	28
6.6 Filtrado y limpieza de secuencias, ensamble <i>de novo</i> .....	28
6.7 Cuantificación de las secuencias.....	29
6.8 Análisis de la expresión diferencial.....	30
6.9 Anotación funcional y análisis de enriquecimiento .....	31
6.10 Incubación de huevos y desarrollo larvario (qPCR).....	31
6.11 Expresión relativa y diferencial de genes del eje tiroideo (qPCR) .....	32
<b>7. RESULTADOS</b> .....	35
7.1 Eclosión del desove.....	35
7.2 Identificación de los genes involucrados al eje hipotálamo-pituitaria-tiroides en larvas de <i>Seriola rivoliana</i> .....	35
7.3 Evaluación de la expresión <i>in silico</i> y en tiempo real de los transcritos involucrados al eje hipotálamo-pituitaria-tiroides durante los dos primeros días de desarrollo a tres diferentes temperaturas (22, 26 y 28 °C) de incubación. ...	41
7.3.1 Transcrito hormona liberadora de tiotropinas: <i>trh</i> .....	41
7.3.2 Transcrito hormona estimulante de la tiroides <i>tshb-like</i> .....	44
7.3.3 Transcrito tiroglobulina: <i>tg</i> .....	48
7.3.4 Transcrito deiodinasa tipo 1: <i>dio1</i> .....	51
7.3.5 Transcrito deiodinasa tipo 2: <i>dio2</i> .....	53
7.3.6 Transcrito receptor de hormona tiroidea alfa: <i>Thra</i> .....	56
7.3.7 Transcrito receptor de hormona tiroidea beta: <i>Thrb</i> .....	59
<b>8. DISCUSION</b> .....	63
8.1 Tasas de eclosión a diferentes temperaturas .....	63
8.2 Hormonas tiroideas en huevos y larvas de peces .....	63
8.3 Hormona liberadora <i>trh</i> y estimulante <i>tsh</i> de tiroides .....	64
8.4 Las hormonas tiroideas en relación con la metamorfosis en los peces .....	65
8.5 Producción de hormonas tiroideas en larvas de peces .....	66
8.6 Receptores nucleares y deiodinasas .....	67
8.7 Comparación de la expresión entre el día dos y seis .....	68

**9. CONCLUSIONES** ..... 69

**10. LITERATURA CITADA**..... 70

**11. ANEXOS** ..... 79

    Anexo A-1..... 79

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Influencia de las hormonas tiroideas en diferentes funciones del organismo (Freake et al., 1987; Nikodem et al., 1990; Samuels, 1984; Van Hardeveld 1986; Venditti et al., 1997).....	2
<b>Figura 2.</b> Eje Hipotalamo – Pituitaria – tiroides (Blanton y Specker, 2007; Eales y Brown, 1993; Eales et al., 1999; Gavrilá y Hollenberg, 2019).....	3
<b>Figura 3.</b> Síntesis de tiroglobulina conjugada y las hormonas T4 y T3 en los folículos tiroideos y su asociación con el proceso de yodación el coloide del folículo (Boron y Boulpaep, 2012).....	5
<b>Figura 4.</b> Estructura de las hormonas tiroideas T4 y T3. La eliminación del yodo puede ocurrir en el anillo interno o externo de la hormona T4, la Dio1 y Dio2 se encargan de la desyodación del anillo fenólico externo, donde T3 activa, y T3 a la forma inactiva T2. (Chopra, 1976).....	7
<b>Figura 5.</b> Las hormonas tiroideas (T4 y T3) entran a la célula por medio de unos transportadores específicos a través de la membrana plasmática. Posteriormente, las hormonas son activadas por las enzimas deiodinasas. Una vez sintetizada las hormonas en su forma activa (T3) esta se unirá a los receptores, que se encuentran en el núcleo, los cuales están estos codificados por dos genes (THRa y THRb) que son los que sintetizan para las diferentes isoformas (Ren y Guo, 2013).....	9
<b>Figura 6.</b> Distribución geográfica (en rojo) de jurel <i>Seriola rivoliana</i> (Fish Base). 20	
<b>Figura 7.</b> Jurel, <i>Seriola rivoliana</i> . Foto por Allen, G. R. y M.V. Erdmann (Fish Base) .....	21
<b>Figura 8.</b> Cuantificación del transcrito de la hormona liberadora de tirotrópina (trh), en la eclosión (día 0) y durante los primeros cuatro días de desarrollo a una temperatura de incubación de 22°C (CPM: conteos por millón). Las barras indican la desviación estándar. ....	42
<b>Figura 9.</b> Expresión diferencial in silico del transcrito de la hormona liberadora de tirotrópina (trh); comparación entre los primeros cinco días de desarrollo larvario a una temperatura de incubación de 22°C.....	42
<b>Figura 10.</b> Comparación de la expresión relativa del transcrito de la hormona liberadora de tirotrópina (trh) (Log2 Fold-Change) de los días uno y día dos a tres diferentes temperatura de incubación de 22°C, 26°C y 28°C (qPCR). Las barras indican el error estándar (S.E.). Las letras diferentes en minúsculas denotan diferencias significativas entre los días y temperaturas evaluadas.....	44
<b>Figura 11.</b> Cuantificación del transcrito de la hormona estimulante de la tiroides (tshb-like), durante los primeros 5 días de desarrollo a una temperatura de incubación de 22°C (CPM: conteos por millón). Las barras indican la desviación estándar.....	45
<b>Figura 12.</b> Expresión diferencial in silico del transcrito de la hormona estimulante de la tiroides (tshb-like), comparación entre los primeros cinco días de desarrollo larvario a una temperatura de incubación de 22°C. Los asteriscos denotan diferencia significativa entre los días evaluados. * FDR < 0.05, ** FDR < 0.01, *** FDR < 0.001.....	46

- Figura 13.** Comparación de la expresión relativa del transcrito de la hormona estimulante de la tiroides (tshb-like) (Log2 Fold-Change) de los días uno y día dos a tres diferentes temperatura de incubación de 22°C, 26°C y 28°C (qPCR). Las barras indican el error estándar (S.E.). Las letras diferentes en mayúsculas denotan diferencias significativas entre el grupo de temperaturas evaluadas. .... 47
- Figura 14.** Cuantificación del transcrito de tiroglobulina (tg), durante los primeros 5 días de desarrollo a una temperatura de incubación de 22°C (CPM: conteos por millón). Las barras indican la desviación estándar..... 48
- Figura 15.** Expresión diferencial in silico del transcrito de tiroglobulina (tg), comparación entre los primeros cinco días de desarrollo larvario a una temperatura de incubación de 22°C. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre los días evaluados. \* FDR < 0.05, \*\* FDR < 0.01, \*\*\* FDR < 0.001..... 49
- Figura 16.** Comparación de la expresión relativa del transcrito de tiroglobulina (tg) (Log2 Fold-Change) de los días uno y día dos a tres diferentes temperatura de incubación de 22°C, 26°C y 28°C (qPCR). Las barras indican el error estándar (S.E.). Las letras diferentes en minúsculas denotan diferencias significativas entre las temperaturas evaluadas. .... 50
- Figura 17.** Cuantificación del transcrito deiodinasa 1 (dio1), durante los primeros 5 días de desarrollo a una temperatura de incubación de 22°C (CPM: conteos por millón). Las barras indican la desviación estándar..... 51
- Figura 18.** Expresión diferencial in silico del transcrito de deiodinasa 1 (dio1), comparación entre los primeros cinco días de desarrollo larvario a una temperatura de incubación de 22°C. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre los días evaluados. . \* FDR < 0.05, \*\* FDR < 0.01, \*\*\* FDR < 0.001..... 52
- Figura 19.** Comparación de la expresión relativa del transcrito de deiodinasa 1 (dio1) (Log2 Fold-Change) de los días uno y día dos a tres diferentes temperatura de incubación de 22°C, 26°C y 28°C (qPCR). Las barras indican el error estándar (S.E.)..... 53
- Figura 20.** Cuantificación del transcrito deiodinasa 1 (dio1), durante los primeros 5 días de desarrollo a una temperatura de incubación de 22°C (CPM: conteos por millón). Las barras indican la desviación estándar..... 54
- Figura 21.** Expresión diferencial in silico del transcrito de deiodinasa 2 (dio2), comparación entre los primeros cinco días de desarrollo larvario a una temperatura de incubación de 22°C. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre los días evaluados. \* FDR < 0.05, \*\* FDR < 0.01, \*\*\* FDR < 0.001..... 54
- Figura 22.** Comparación de la expresión relativa del transcrito de deiodinasa 2 (dio2) (Log2 Fold-Change) de los días uno y día dos a tres diferentes temperatura de incubación de 22°C, 26°C y 28°C (qPCR). Las barras indican el error estándar (S.E.)..... 55
- Figura 23.** Cuantificación del transcrito receptor de hormona tiroidea alpha B variante X2 (trha-B X2), durante los primeros 5 días de desarrollo a una

- temperatura de incubación de 22°C (CPM: conteos por millón). Las barras indican la desviación estándar (S.D.). ..... 56
- Figura 24.** Expresión diferencial in silico del transcrito receptor de hormona tiroidea alpha B variante X2 (thra-B X2), comparación entre los primeros cinco días de desarrollo larvario a una temperatura de incubación de 22°C. Los asteriscos denotan diferencias si significativas entre los días evaluados. \*  $FDR < 0.05$ , \*\*  $FDR < 0.01$ , \*\*\*  $FDR < 0.001$ . ..... 57
- Figura 25.** Comparación de la expresión relativa del transcrito receptor de hormona tiroidea alpha B variante X2 (thra-B X2) (Log2 Fold-Change) de los días uno y día dos a tres diferentes temperatura de incubación de 22°C, 26°C y 28°C (qPCR). Las barras indican el error estándar (S.E.)..... 58
- Figura 26.** Cuantificación del transcrito receptor beta de la hormona tiroidea variante X1 (thb X1), durante los primeros 5 días de desarrollo a una temperatura de incubación de 22°C (CPM: conteos por millón). Las barras indican la desviación estándar (S.D.)..... 59
- Figura 27.** Expresión diferencial in silico del transcrito receptor beta de la hormona tiroidea variante X1 (thrb X1), comparación entre los primeros cinco días de desarrollo larvario a una temperatura de incubación de 22°C. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre los días evaluados. \*  $FDR < 0.05$ , \*\*  $FDR < 0.01$ , \*\*\*  $FDR < 0.001$ ..... 60
- Figura 28.** Comparación de la expresión relativa del transcrito receptor beta de la hormona tiroidea variante X1 (thb X1) (Log2 Fold-Change) de los días uno y día dos a tres diferentes temperatura de incubación de 22°C, 26°C y 28°C (qPCR). Las barras indican el error estándar (S.E.) ..... 61
- Figura 29.** Comparación de todos los genes evaluados del eje tiroideo entre el día dos y el día seis a 22°C, mostrando una expresión diferencial significativa en cada uno de ellos, con la excepción de los receptores nucleares. .... 62



## Lista de Tablas

<b>Tabla I.</b> Oligos específicos de los genes del eje hipotálamo-pituitaria-tiroides y factor de elongación diseñados a partir de secuencias parciales (predichas in silico) ya reportadas en <i>Seriola lalandi</i> , así como los números de acceso de GenBank. ....	33
<b>Tabla II.</b> Transcritos identificados de la hormona liberadora de tiotropina. ....	36
<b>Tabla III.</b> Transcritos identificados de la hormona estimulante de la tiroides. ....	37
<b>Tabla IV.</b> Transcrito identificado de tiroglobulina. ....	38
<b>Tabla V.</b> Transcritos identificados de receptor tiroideo. ....	39
<b>Tabla VI.</b> Transcritos identificados de deiodinasas. ....	40
<b>Tabla VII.</b> Secuencia obtenida del transcriptoma para la hormona liberadora de tiotropinas. ....	79
<b>Tabla VIII.</b> Secuencia obtenida del transcriptoma para la hormona estimulante de la tiroides. ....	80
<b>Tabla IX.</b> Secuencia obtenida del transcriptoma para tiroglobulina. ....	81
<b>Tabla X.</b> Secuencia obtenida del transcriptoma para Deiodinasa tipo 1. ....	86
<b>Tabla XI.</b> Secuencia obtenida del transcriptoma para Deiodinasa tipo 2. ....	87
<b>Tabla XII.</b> Secuencia obtenida del transcriptoma para el receptor de hormona tiroidea alfa. ....	88
<b>Tabla XIII.</b> Secuencia obtenida del transcriptoma para receptor de hormona tiroidea beta. ....	91

## **Abreviaturas**

**Trh:** Hormona liberadora de tirotropinas

**Tsh:** Hormona estimulante de tiroides

**Tg:** Tiroglobulina

**Dio:** Diodinasa

**Thr:** Receptor de hormona tiroidea

**ANOVA** análisis de varianza

**FDR:** Tasa de descubrimiento falso

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Hormonas tiroideas**

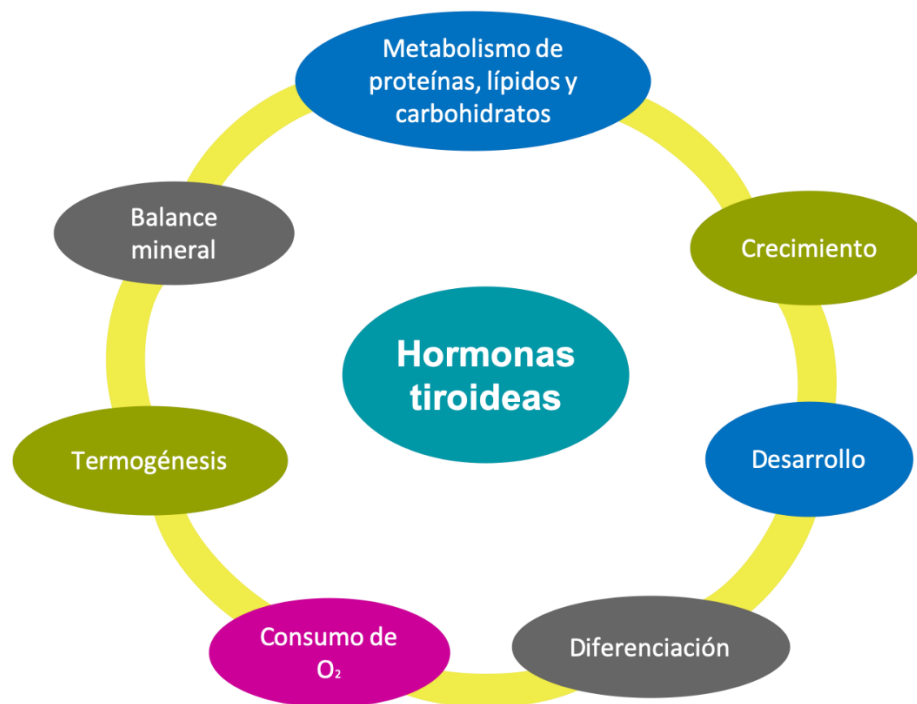
El estudio de las hormonas tiroideas y sus efectos en los vertebrados se ha llevado a cabo desde la década de los 80's. El eje endocrino hipotálamo-pituitario-adrenal se ha conservado en los vertebrados con características particulares en cada taxón y de éste depende el eje hipotálamo-pituitario-tiroides (Castañeda Cortes *et al*, 2014; Pittman *et al.*, 2013; Power *et al.*, 2001). Las hormonas tiroideas se encuentran involucradas en varios procesos biológicos en los vertebrados como la regulación del metabolismo, el crecimiento, desarrollo, reproducción, metamorfosis, la respiración, comportamiento migratorio, adaptación, actividad del sistema nervioso central y maduración neuronal entre otros (Bloise *et al.*, 2018; Castañeda-Cortes *et al*, 2014; Mullur *et al.*, 2014; Tovo-Neto *et al.*, 2018).

En particular en los peces, la presencia de hormonas tiroideas es relevante durante las primeras etapas de desarrollo, como la organogénesis, el desarrollo de sistemas y la maduración de eritrocitos (Campinho *et al.*, 2010; Deane y Woo, 2003; Klaren *et al.*, 2008; Ortiz-Delgado *et al.*, 2006; Power *et al.*, 2001), (Fig. 1).

### **1.2 Eje Hipotálamo- pituitario- tiroides**

El eje hipotálamo-pituitaria-tiroides se encuentra en todos los vertebrados y se encuentra altamente conservado, solo presentando algunas diferencias dependiendo de la especie (Power *et al.*, 2001). Los peces tienen un sistema neuroendocrino que les ayuda a coordinar los procesos fisiológicos vitales, en donde se estimulan los folículos tiroideos para producir las hormonas: tiroxina (T4), triyodotironina (T3) y diyodotironina (T2). (Peter, 2011; Power *et al.*, 2001). Este sistema complejo neuroendocrino recibe señales de origen intrínseco y

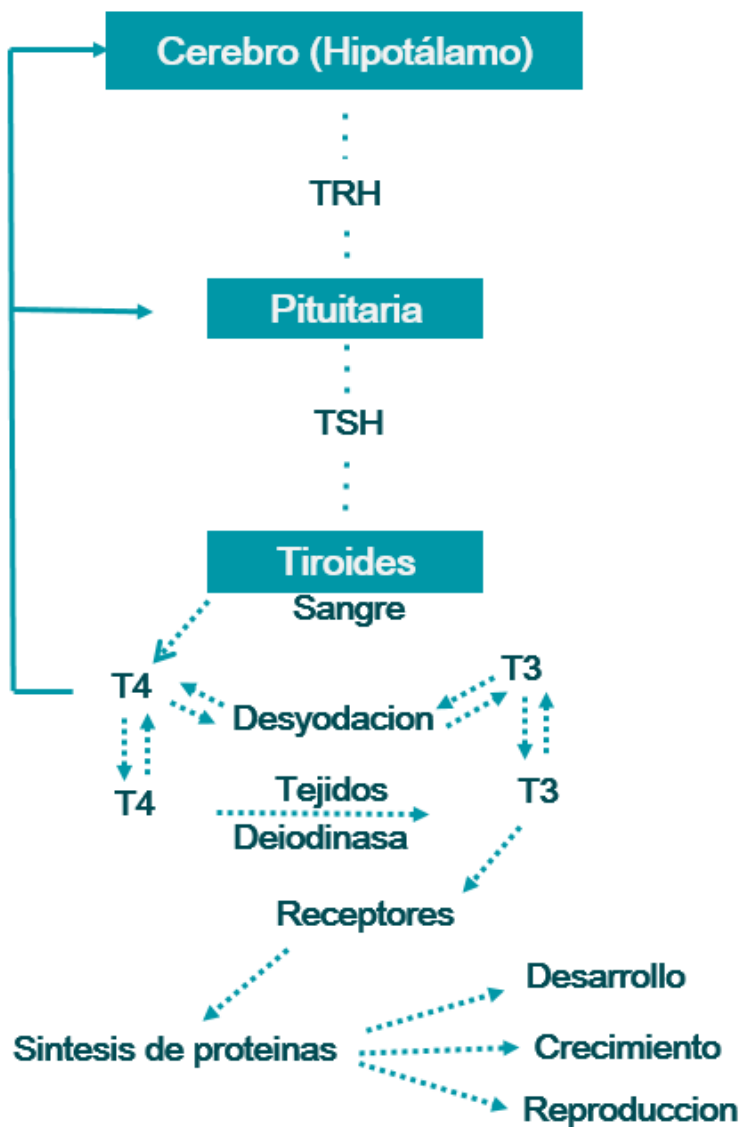
extrínseco, dando respuestas al estrés que pueda percibir cada individuo (Peter, 2011).



**Figura 1.** Influencia de las hormonas tiroideas en diferentes funciones del organismo (Freake *et al.*, 1987; Nikodem *et al.*, 1990; Samuels, 1984; Van Hardeveld 1986; Venditti *et al.*, 1997).

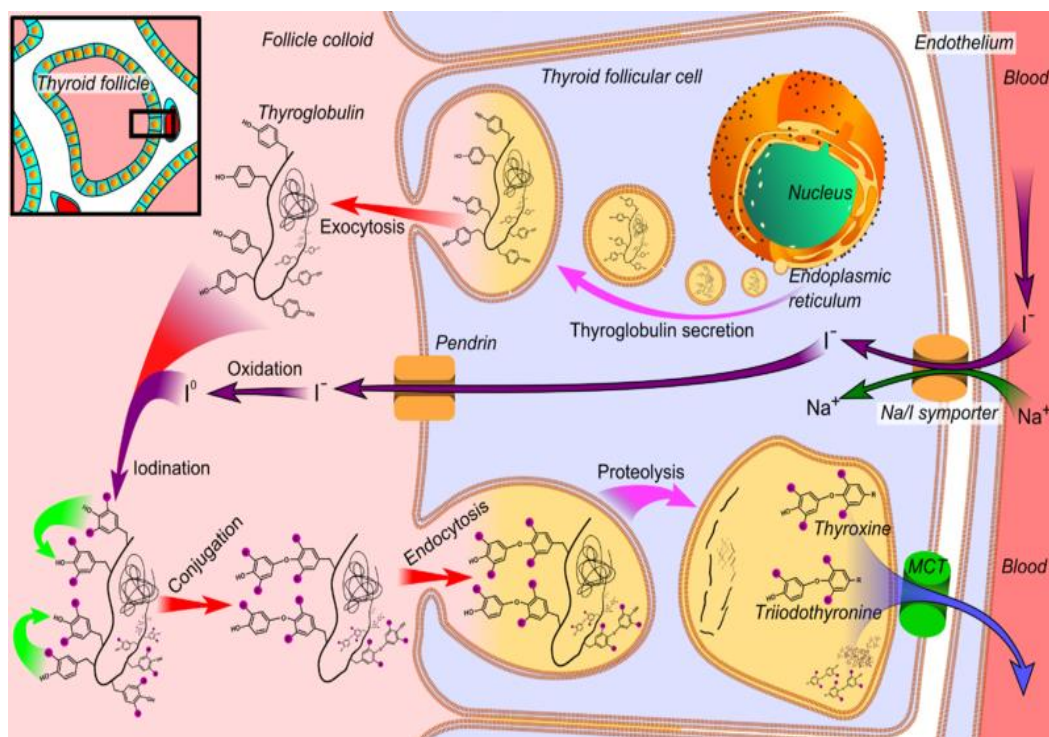
El eje tiroideo comienza con una estimulación del cerebro y por consiguiente el hipotálamo, a través de señales externas e internas. Estos estímulos conducen al hipotálamo a secretar la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) y esta a su vez, enviará una estimulación a las células tirotróficas en la glándula pituitaria, para que estas secreten la hormona estimulante de la tiroides (TSH) (Pitman *et al.*, 2013; Power *et al.*, 2001). La TSH actúa sobre los tirocitos para estimular la liberación de la hormona de tiroglobulina que se encuentra en los folículos tiroideos. La tiroglobulina es producida por los tirocitos, los cuales se encuentran en la pared de los folículos de la tiroides y al combinarse con el yodo extracelular y el aminoácido

tirosina, se forman las hormonas T4 y T3 (Carvalho y Dupuy, 2017; Pitman *et al.*, 2013) (Fig. 2).



**Figura 2.** Eje Hipotálamo – Pituitaria – tiroides (Blanton y Specker, 2007; Eales y Brown, 1993; Eales *et al.*, 1999; Gavrila y Hollenberg, 2019).

Los folículos tiroideos tienen dos regiones: las células foliculares y su medio externo compuesto por una región coloidal, es decir, las células foliculares están rodeadas por un coloide y cada región tiene una función en la síntesis de hormonas tiroideas. El yodo se transporta desde los vasos sanguíneos a los folículos tiroideos y entra al citoplasma de los tirocitos usando un transporte activo de sodio/yodo. La enzima pendrina actúa como un transportador y permite la salida del yodo del citoplasma hacia la región coloidal de los tirocitos. La tiroglobulina es sintetizada en el retículo endoplásmico y sale a la región coloidal de los tirocitos por medio de exocitosis. Una vez que el yodo, la tiroglobulina y las enzimas deiodinasas se encuentran en la región coloidal, el yoduro es oxidado para después yodar los residuos de tiroxina de la tiroglobulina conjugando monoyodotirosinas o diyodotirosinas, aún dentro de la misma estructura de la tiroglobulina. La tiroglobulina conjugada vuelve a entrar al citoplasma de las células foliculares por medio de la endocitosis, en donde por medio de una proteólisis se sintetizan la tiroxina (T4) y con la desyodación por medio de las deiodinasas, la triyodotironina (T3). Finalmente, las hormonas tiroideas se unen a lisosomas y por medio de una proteína transmembrana son liberadas en la sangre. Las hormonas tiroideas viajarán en el torrente sanguíneo conjugadas con proteínas transportadoras como la albumina para T4 y transtiretina para T3, a los tejidos periféricos. Una vez en los tejidos, estas hormonas tienen una naturaleza lipófila, y pueden atravesar la membrana plasmática y llegar al citoplasma, en donde la T4 se convierte en T3 (forma activa de la hormona) gracias a la actividad de las enzimas deiodinasas (Pittman *et al.*, 2003; Boron y Boulpaep, 2012) (Fig. 3).



**Figura 3.** Síntesis de tiroglobulina conjugada y las hormonas T4 y T3 en los folículos tiroideos y su asociación con el proceso de yodación el coloides del folículo (Boron y Boulpaep, 2012).

### 1.3 Regulación de las hormonas tiroideas

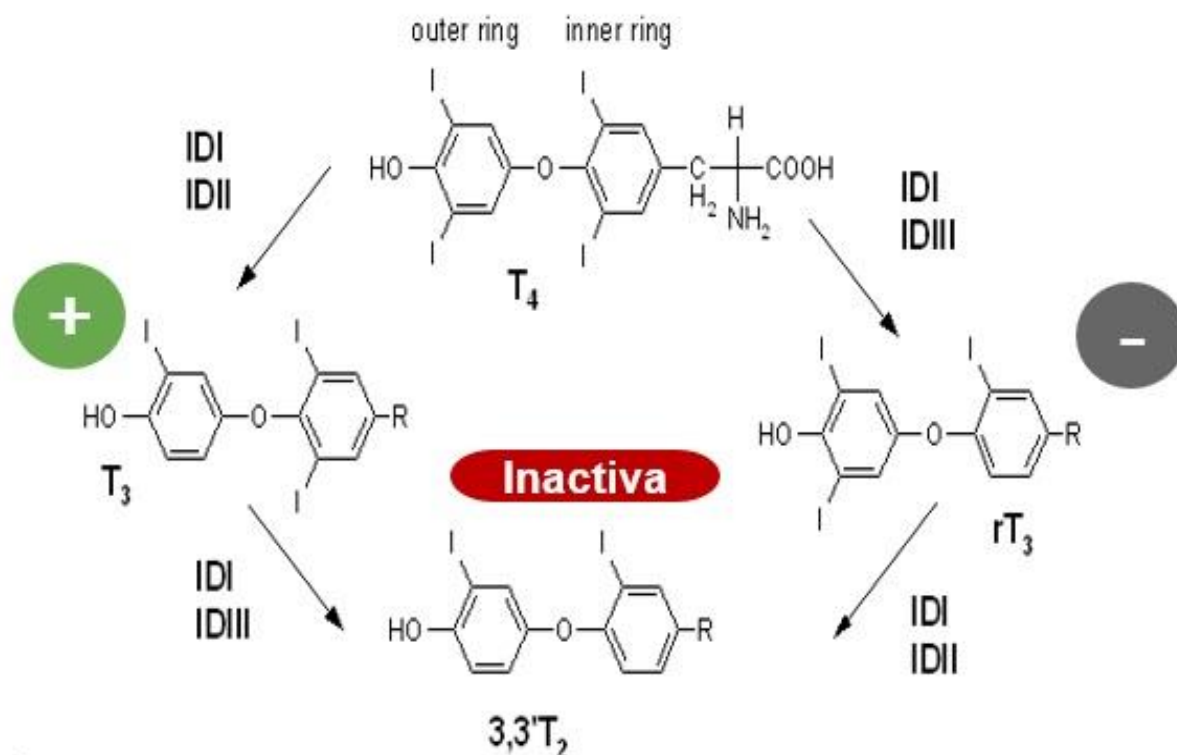
El eje hipotálamo-pituitaria-tiroideas tiene varios puntos de regulación, una vez que las hormonas tiroideas son sintetizadas y liberadas al torrente sanguíneo para que estas lleguen a los órganos periféricos, estas hormonas inhiben a la hormona TRH, también inhiben la síntesis y secreción de TSH, por medio de una retroalimentación negativa (Power *et al.*, 2001). Otro de los puntos de regulación de este eje, es el transporte a través de la membrana plasmática, ya que por su naturaleza lipofílica, atraviesan la membrana a través de una proteína transportadora. Ambas hormonas circulan en el plasma ligadas a proteínas como la albúmina, la transtiretina y la globulina ligada a tiroxina en vertebrados y en

peces las lipoproteínas también juegan un papel importante en la transportación (Power *et al.*, 2001). Las enzimas deiodinasas son otro punto de regulación, controlando el estado de la tiroides al eliminar el yodo. Las deiodinasas tipo 1 y tipo 2 (Dio1 y Dio2) son las enzimas que se encargan de sintetizar la conversión de T4 a T3 en las hormonas tiroideas (Power *et al.*, 2001). La hormona T4 es una pre-hormona que se convierte en la hormona activa T3, gracias a las enzimas deiodinasas, aunque existe otra vía por la que la hormona T4 puede volverse activa. La conversión de T4 en T3 es gracias a la eliminación de yodo en el anillo externo de la hormona T4 (Visser, 2019). La hormona T4 se encuentra en una mayor concentración en la sangre, sin embargo, la forma activa de hormona T3 es de tres a cuatro veces más potente, pero de una vida más corta (Hadley, 1992) (Fig.4).

#### **1.4 Receptores de hormonas tiroideas**

Una vez que las hormonas tiroideas entran a la célula, estas tienen que conjugarse con unos receptores nucleares para realizar la transcripción. Se han identificado dos tipos de receptores: el receptor tiroideo alfa (TR $\alpha$ ) y el receptor tiroidea beta (TR $\beta$ ), los cuales tienen isoformas cada uno. Para el receptor alfa, se han descrito las isoformas TR $\alpha$ 1, TR $\alpha$ 2; y para el receptor beta se han descritos las isoformas TR $\beta$ 1 y TR $\beta$ 2, las cuales tienen funciones específicas dependiendo del tejido. Los genes que codifican a estos receptores son los TRHa y el TRHb. Las secuencias de estos se ha visto que está altamente conservada en todas las especies (Mangelsdorf *et al.*, 1995; Samaraut y Plateroti, 2018; Sinha y Yen, 2018; Yamano *et al.*, 1994).



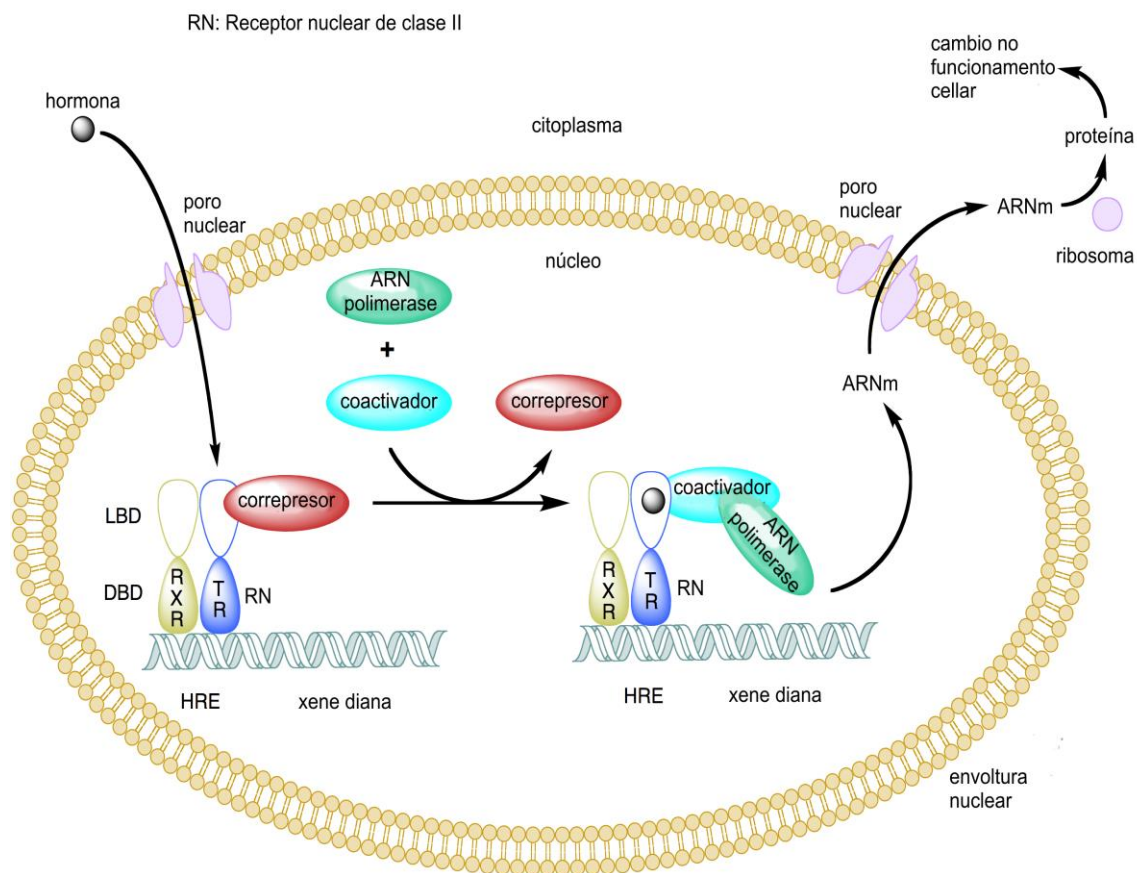


**Figura 4.** Estructura de las hormonas tiroideas  $T_4$  y  $T_3$ . La eliminación del yodo puede ocurrir en el anillo interno o externo de la hormona  $T_4$ , la Dio1 y Dio2 se encargan de la desyodación del anillo fenólico externo, donde  $T_3$  activa, y  $T_3$  a la forma inactiva  $T_2$ . (Chopra, 1976).

El receptor  $TR\alpha$ , en sus isoformas 1 y 2, concretamente la isoforma 1 ( $TR\alpha 1$ ) se ha visto que se expresa en las etapas más tempranas en anfibios. El receptor beta isoforma 1 ( $TR\beta 1$ ) es el que tiene una mayor expresión en el hígado, a diferencia de la isoforma 2 ( $TR\beta 2$ ) que se expresa principalmente en las neuronas y en la glándula pituitaria, en el oído y la retina, ayudando a que estos se desarrollen. Un estudio realizado en el pez zebra demostró que los receptores de las hormonas tiroideas tienen un dominio regulado por un amino terminal, un dominio de unión al ADN y un dominio de unión a la hormona carboxilo terminal, y que estos dominios

se encuentran altamente conservados entre especies de mamíferos, aves y peces, llegando a una identidad del 90 al 95% de similitud. Se ha observado que estos receptores se expresan desde las primeras horas de desarrollo, donde el gen *THRb* predominó sobre el gen *THRa*, aunque también se contempla que los ARNm para estos dos genes también provienen del plasma materno durante la ovogénesis (Liu y Chan, 2002).

La acción de las hormonas tiroideas está mediada por su unión a receptores nucleares que actúan directamente en genes específicos, uniéndose a secuencias de ADN específicas para aumentar o disminuir la expresión de cada gen y provocar una respuesta celular a hormonas tiroideas. Los receptores de hormonas tiroideas forman parte de la súper familia de receptores esteroideos y por ende compiten con hormonas esteroideas, retinoides, la melatonina y la vitamina D3, lo cual pudiera conllevar a una mortalidad de la progenie en peces (Yen y Chin, 1994). El receptor alfa ( $\alpha$ ) presenta una alta expresión especialmente en los músculos cardiacos y esqueléticos. El receptor beta1 ( $\beta$ 1) se expresa principalmente en el cerebro, hígado y los riñones y beta2 ( $\beta$ 2) se limita al hipotálamo y la pituitaria. Se ha investigado que el momento de la expresión de estas isoformas durante la embriogénesis es crítico (Ren y Guo, 2013) (Fig.5).



**Figura 5.** Las hormonas tiroideas (T4 y T3) entran a la célula por medio de unos transportadores específicos a través de la membrana plasmática. Posteriormente, las hormonas son activadas por las enzimas deiodinasas. Una vez sintetizada las hormonas en su forma activa (T3) esta se unirá a los receptores, que se encuentran en el núcleo, los cuales están codificados por dos genes (THRa y THRb) que son los que sintetizan para las diferentes isoformas (Ren y Guo, 2013).

### 1.5 Efecto de la temperatura en las hormonas tiroideas

Los vertebrados son influenciados por las variaciones ambientales ajustándose a respuestas conductuales y fisiológicas, que permiten la adaptación al estrés, que se genera por cambios bruscos de la temperatura (Pankhurst, 2011). Estas

respuestas se provocan como una reacción para sobrevivir, lo que conlleva a cambios de hábitat en busca de una temperatura adecuada para las necesidades de óptimo funcionamiento (Özeren *et al.*, 2019). Bajo condiciones de alta temperatura, los animales cambian su nutrición y reducen la ingesta de alimento, todo bajo el control endocrino (Özeren *et al.*, 2019). En particular, los peces, son incapaces de regular su temperatura (poiquilodermos), por tanto, es indispensable que se mantengan en un rango óptimo en la columna de agua, para poder desempeñar sus funciones fisiológicas de la mejor manera posible, ya que se ha observado que los niveles de T3 y T4 se modifican de manera inversamente proporcional a la temperatura del agua (Pankhurst, 2011). Este cambio puede deberse a la adaptación y/o disminución de la actividad metabólica (Özeren *et al.*, 2019). La activación del eje hipotalámico-pituitario-tiroides muestra en general una fuerte independencia a la temperatura y la mayoría de los teleósteos muestran un aumento medible del cortisol plasmático dentro de los 10 minutos posteriores a un estímulo estresor afectando de este modo la función tiroidea (Pankhurst, 2011).

### **1.6 Elementos traza relacionados con la síntesis de la hormona tiroidea**

La síntesis de hormona tiroidea, así como su metabolismo y acción (homeostasis), requiere una adecuada disponibilidad de elementos traza como lo son el yodo (I) y el selenio (Se), así como otros minerales tales como el hierro (Fe), zinc (Zn), calcio (Ca) y magnesio (Mg) (Köhrle, 2005; Köhrle *et al.*, 2005).

En todos los animales, incluyendo a los peces, además de requerir vitaminas estos requieren de minerales para la correcta función del metabolismo celular. En los peces, estos son obtenidos de la dieta, así como del ambiente donde se desarrollan. Los minerales son los responsables de diversos procesos incluyendo la estructura y función de enzimas y hormonas. Yodo (I) y selenio (Se) son elementos traza importantes en peces y se requieren en cantidades de 1-4 y de

0.15-0.5 mg kg<sup>-1</sup> respectivamente para la correcta función del metabolismo. En peces, el I y Se derivan de la dieta y del agua (Watanabe *et al.*, 1997).

### **1.7 Selenio**

El Selenio (Se) es un oligoelemento esencial para la correcta función fisiológica mediante la incorporación de selenoproteínas que influyen en el crecimiento de los peces (Wang *et al.*, 2018). A través de la biosíntesis controlada de la deiodinasa; enzima selenio-dependiente en tejidos extra tiroideos que convierte la hormona tiroidea (T4) en triyodotironina (T3, la forma activa), se regula el crecimiento de los mamíferos (Tovo-Neto *et al.*, 2018). Sin embargo, se han caracterizado hasta 41 selenoproteínas en teleósteos, lo que hace pensar que otras selenoproteínas, podrían estar involucradas en regular su crecimiento (Wang *et al.*, 2018). Deficiencias de selenio en la dieta, causa una elevada mortalidad en peces (Tovo-Neto, *et al.*, 2018).

### **1.8 Yodo.**

El yodo existe en la glándula tiroides en forma de diyodotirosina y tiroxina. Estos dos compuestos se combinan con otros aminoácidos para formar la proteína tiroidea característica, la tiroglobulina. La glándula tiroides toma y concentra el yoduro que se usa para sintetizar moléculas biológicamente activas conocidas como hormonas tiroideas (Bianco y Conceição, 2018). En los animales incluyendo a los peces (Watanabe *et al.*, 1997), las hormonas tiroideas desempeñan un papel fundamental en la regulación de procesos biológicos, tales como la morfogénesis, reproducción, crecimiento, metabolismo e influyen en el desarrollo temprano de la vida de los peces (Politis *et al.*, 2017; Tovo-Neto *et al.*, 2018). Algunos de los efectos más destacados de las hormonas tiroideas en mamíferos ocurren durante el desarrollo fetal y la primera infancia. Por tanto, el yodo es un elemento esencial para el correcto funcionamiento del metabolismo (Sinha and Yen, 2018).

### **1.9 Vitaminas**

Todas las vitaminas son esenciales para la homeostasis en peces, incluyendo el estadio larvario. De estas, la vitamina A (ácido retinoico) es esencial para establecer los ejes del cuerpo y órganos en embriones de los vertebrados. (Hamre *et al.*, 2010).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Expresión diferencial de genes

La expresión génica es el proceso mediante el cual la información de un gen se utiliza en la síntesis de un producto génico funcional, las proteínas. La producción de proteínas comienza en la transcripción, en donde el ADN se transcribe a ARN, y continúa con la traducción, en donde los ARN mensajeros (ARNm) se traducen en proteínas. Estos dos procesos determinan qué proteínas están presentes en una célula y en qué cantidades. En una célula se expresan miles de genes que codifican proteínas y dictan la función celular. Sin embargo, el flujo de información del ADN al ARN y a la proteína proporciona a la célula un punto de control potencial para autorregular sus funciones, ajustando la cantidad y el tipo de proteínas que produce. El desarrollo temprano en la mayoría de los animales depende del control de la traducción porque se produce muy poca transcripción durante las primeras divisiones celulares después de la fertilización. Por lo tanto, los huevos contienen mucho ARNm de origen materno como una reserva lista para la traducción después de la fertilización (O'Connor y Adams, 2010).

En una célula, solo una fracción de los genes se expresa a la vez, lo que produce una variedad de perfiles de expresión génica característicos en diferentes tipos de tejidos y órganos y en donde las células tienen distintos conjuntos de reguladores proteicos de la transcripción. Algunos de estos reguladores trabajan para aumentar la transcripción, mientras que otros la previenen o suprimen (O'Connor y Adams, 2010).

La expresión génica puede incrementar o disminuir en respuesta a un cambio ambiental (O'Connor y Adams, 2010). Por lo tanto, la abundancia de transcritos será diferente en el transcriptoma dependiendo de la respuesta al ambiente, por lo que un cambio en la expresión o bien, la expresión diferencial, es la capacidad de

un organismo para responder a un entorno externo en constante cambio, en donde existirá una variedad específica de proteínas requeridas para una función óptima (Matthews y Nichols, 1997).

El advenimiento de las tecnologías de secuenciación de próxima generación ha impulsado una aceleración masiva en investigación y desarrollo. Esto se debe a un menor costo por base secuenciada y en el aumento en la cobertura de secuenciación de transcritos en cualquier especie. La secuenciación de ARN-sec (RNA-seq) no requiere conocimiento previo de una secuencia específica y es capaz de detectar incluso genes que presentan una baja expresión (Wang *et al.*, 2009). Por otro lado, la técnica de transcriptasa reversa, seguida de la reacción en cadena de polimerasa (RT-qPCR) (Porcher *et al.*, 1992) representa el método de elección para analizar la expresión génica de un pequeño número de genes en muchas muestras y para confirmar la expresión génica obtenida *in silico* mediante el análisis de bioinformática.

## **2.2 Estudios de hormonas tiroideas en peces**

Las hormonas tiroideas se encuentran involucradas en varios procesos biológicos en los peces, ya que intervienen en la regulación del metabolismo, el crecimiento, desarrollo y reproducción, entre otros (Castañeda Cortes *et al.*, 2014). Las hormonas tiroideas pueden ser detectadas en los huevos ya que estas son de origen materno, en las primeras etapas de desarrollo (Power *et al.*, 2001 Tagawa *et al.*, 1994). Generalmente la concentración de la hormona tiroidea T4 es mayor que T3 en peces de agua dulce, por el contrario, en huevos de peces marinos, en donde la T3 se encuentra en una mayor concentración, y conforme avanza la embriogénesis, la concentración de las hormonas tiroideas comienza a disminuir (Power *et al.*, 2001).



Las hormonas tiroideas están involucradas en diferentes procesos de los vertebrados. En los peces estas hormonas tienen un papel importante en el desarrollo en etapas tempranas como la metamorfosis y la transición de larva a juvenil (Liu y Chan, 2002). Sin embargo, la mayoría de los peces teleósteos no presentan una glándula tiroides encapsulada, ya que se encuentran como folículos tiroideos a lo largo de la aorta ventral, encontrándose frecuentemente sobre las arterias branquiales, que pueden presentarse individual o en grupo (Yamano, 2005) o bien haber migrado como folículos en otros órganos como el hígado, riñón, entre otros (Lagler *et al.*, 1977). Un folículo tiroideo está formado por células epiteliales que están rodeadas por una membrana basal ya que estas son estructuras especializadas de la matriz extracelular y se encuentran en los límites entre la célula y los tejidos conectivos (Yamano, 2005). La glándula tiroides no está presente en embriones de peces, por lo que el proceso en etapas tempranas debe ser impulsado por las hormonas tiroideas maternas (Lam, 1994).

Varios estudios han demostrado los efectos beneficiosos del aumento de los niveles de la hormona T3 materna en el desarrollo y la supervivencia larval, como en la lubina rayada (Brown *et al.*, 1989). Sin embargo, en otras especies se han observado efectos negativos con una mayor mortalidad o deformidades, como en la trucha café *Salmo trutta* y la carpa común *Cyprinus carpio* (Lam y Sharma, 1985; Mylonas *et al.*, 1994). La administración de T4 endógena puede inducir una metamorfosis precoz y puede aumentar la tasa de transformación en diferentes especies como el lenguado *Paralichthys olivaceus* (Inui *et al.*, 1989; Inui y Miwa, 1985; Yamano *et al.*, 1991). Sin embargo, aún existe controversia sobre el efecto en el uso de hormonas tiroides durante el desarrollo temprano de larvas (Power *et al.*, 2001).

Uno de los primeros estudios en peces se realizó en el salmón del Pacífico *Oncorhynchus* spp, salmón del Atlántico *Salmo salar*, y en la lubina rayada *Morone saxatilis*, en donde se evidenció que las hormonas tiroideas T4 y T3 se depositan de la madre al huevo y son utilizadas durante la absorción del saco vitelino en el periodo larvario, para posteriormente ser sintetizadas por la larva en su periodo de alimentación exógena (Brown *et al.*, 1987). En la lubina rayada también se evidenció un efecto por temperatura y salinidad en la concentración de T3 y T4 en larvas, en donde fluctuaron durante la metamorfosis de esta especie, particularmente en altas salinidades. Otros estudios corroboraron la presencia de hormonas tiroideas como el caso la tilapia *Sarotherodon mossambicus* en donde la hormona tiroidea T3 ocasionó un desarrollo más acelerado en los peces (Lam *et al.*, 1980). En el pez zebra se sugiere que las células precursoras de los folículos tiroideos aparecen un día después de la eclosión (Rohn y Concha, 2000). En la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* estudiaron el patrón de desyodación de T4 a T3 en el hígado a diferentes temperaturas de 4, 13 y 18 °C, encontrando que conforme aumenta la temperatura, se incrementa la actividad enzimática en la eliminación de yodo de la hormona T4 (Johnston y Eales, 1995). Se ha observado que la concentración en plasma de las hormonas T3 y T4 variaron de forma estacional en el bacalao del Atlántico *Gadus morhua*, incrementándose desde el verano al invierno y decayendo en primavera, sin embargo, los datos mostraron una baja correlación con la temperatura (Comeau *et al.*, 2000). En el sargo plateado *Sparus sarba*, las hormonas tiroideas se detectaron un día después de la eclosión (Deane y Woo, 2003). Un estudio en la anguila europea *Anguilla anguilla* mostró que las hormonas tiroideas controlan el desarrollo temprano de esta especie a través de la expresión de los receptores de las hormonas tiroideas (Kawakami *et al.*, 2013). Posteriormente, otro estudio en esta especie determinó el efecto de la temperatura en la expresión de los genes de los receptores de hormonas tiroideas (*thr*) y deiodinasas (*dio*) durante los primeros dos días de desarrollo larvario, cultivadas en un rango de 16 a 22 °C. Se identificaron dos subtipos de *thr* (*thra* y *thrb*) con dos isoformas cada una (*thraA*, *thraB*, *thrbA* y

*thrbB*) y tres subtipos de deiodinasas (*dio1*, *dio2* y *dio3*). Todos los genes investigados en este estudio se vieron afectados por la temperatura con respecto al día larval, en donde encontraron que entre más alta la temperatura, la expresión génica fue significativamente mayor (Politis *et al.*, 2017).

### **2.3 Efecto de factores ambientales en la piscicultura**

En muchas especies, la reproducción solo se obtiene con la inducción de hormonas, como ocurre en los serránidos (Romo-Mendoza *et al.*, 2017; Rottmann *et al.*, 1991), mientras que en otras especies, en donde se simulan los factores ambientales naturales propios de la especie de interés, los reproductores se reproducen de manera natural en los tanques y producen desoves espontáneos, como es el caso del jurel *Seriola rivoliana*. Sin embargo, la cría de larvas todavía representa un desafío biotecnológico en la industria de la acuicultura. Los peces pelágicos marinos tienen una alta fecundidad durante su estación reproductiva, sin embargo, ocurre una elevada mortalidad de huevos y larvas debido a la interacción de factores medioambientales (Buckley, 1984). El mismo escenario se observa en las especies de peces cultivados, en donde los factores abióticos producen estrés y altas mortalidades durante el desarrollo temprano (Alvarez-Lajonchère *et al.*, 2011). La alta mortalidad en la etapa larvaria puede estar relacionada a varios factores entre los cuales se encuentran los fisicoquímicos (salinidad, oxígeno, pH, temperatura), la presencia de algunos agentes patógenos, calidad del alimento, calidad del desove entre otros (Ferron y Leggett, 1994).

### **2.4 Efecto de la temperatura en el desarrollo larvario de peces**

La temperatura es uno de los factores principales que afecta el crecimiento, la supervivencia y la utilización de los nutrientes ya que los peces son poiquilotermos y en su ambiente natural se adaptan con relación a la temperatura del agua, esta influye directamente en las funciones metabólicas de los organismos, el proceso de digestión, la actividad enzimática, entre otras (Heming y Buddington, 1988). La

temperatura favorece a las actividades fisiológicas de los organismos en donde se desarrollan óptimamente, en donde la mayoría de las especies de peces buscan zonas que se acerquen a su temperatura óptima para poder desarrollarse y crecer, pero cuando la especie es cultivada con temperaturas que están fuera de su rango, su crecimiento y desarrollo se verá afectado (Despatie *et al.*, 2001; Kinne y Kinne, 1962). La energía que se necesita para el crecimiento del pez se lleve a cabo de la mejor manera, resultará de la diferencia entre la energía que se asimila y la que utilizará para su mantenimiento metabólico (Bowyer *et al.*, 2013). Las variaciones de la temperatura en etapas tempranas afectan el desarrollo y crecimiento en órganos, tejidos y diferenciación celular, también se ha visto que la temperatura del agua tiene un efecto sobre el desove y el desarrollo embrionario, específicamente cómo se utilizan las reservas endógenas, tanto el saco vitelino, así como la gota de aceite (Ojanguren y Braña 2003; Rønnestad *et al.*, 1998). La temperatura modifica el tiempo de incubación de los huevos, la velocidad en la formación de tejido, la morfología larvaria, el crecimiento, la utilización de energía y las tasas metabólicas (Blaxter, 1969,1992; Blaxter y Hempel, 1963; Kamler, 1992).

## **2.6 Desarrollo larvario en peces**

A diferencia de los peces de agua dulce en donde los huevos son más grandes y contienen mucho vitelo, los huevos de peces marinos son pequeños, alrededor de 1 mm, y la larva consume el vitelo en pocos días (3 a 5 días en general) y debe de solventar el haber desarrollado la capacidad de capturar presas zooplanctónicas en movimiento, lo que involucra la apertura de la boca, cierta capacidad de locomoción y cierta agudeza visual, así como adquirir en ese momento cierta maduración del sistema digestivo para digerir a sus presas; es decir, una aceleración de procesos metabólicos que le permitan sobrevivir, dado que si algo no se desarrolla adecuadamente, la larva morirá de hambruna, dos o tres días después de haber agotado sus reservas de vitelo (Kjørsvik *et al.*, 2004).

El desarrollo larvario de peces marinos comienza una vez que eclosionan los huevos y se obtienen las larvas, las cuales dependerán de la absorción de todas las reservas del vitelo y gota de aceite, para así entonces comenzar la alimentación exógena, etapa en la cual se presenta una alta mortalidad en cultivo y también en el medio natural (Yúfera y Darías, 2007). La alta mortalidad en la fase larvaria se puede deber a una mala alimentación en los primeros días de vida, aunque también se asocia a la especie y la calidad del desove que da el reproductor (Yúfera y Darías, 2007). Con lo anterior, la producción de larvas de buena calidad sigue siendo el cuello de botella para el desarrollo de la acuicultura para cualquier especie marina, considerando además que en esta etapa las larvas pasan por una metamorfosis y comienzan a desarrollar algunos tejidos y órganos, el sistema digestivo, entre otros cambios morfológicos y fisiológicos (Govoni *et al*, 1986). Es por esto que se requieren de investigaciones precisas para optimizar las condiciones del manejo del cultivo para obtener una alta tasa de supervivencia. Es necesario generar conocimiento en diferentes disciplinas biológicas con el objetivo de incorporar nuevas especies con un auge comercial a la acuicultura.

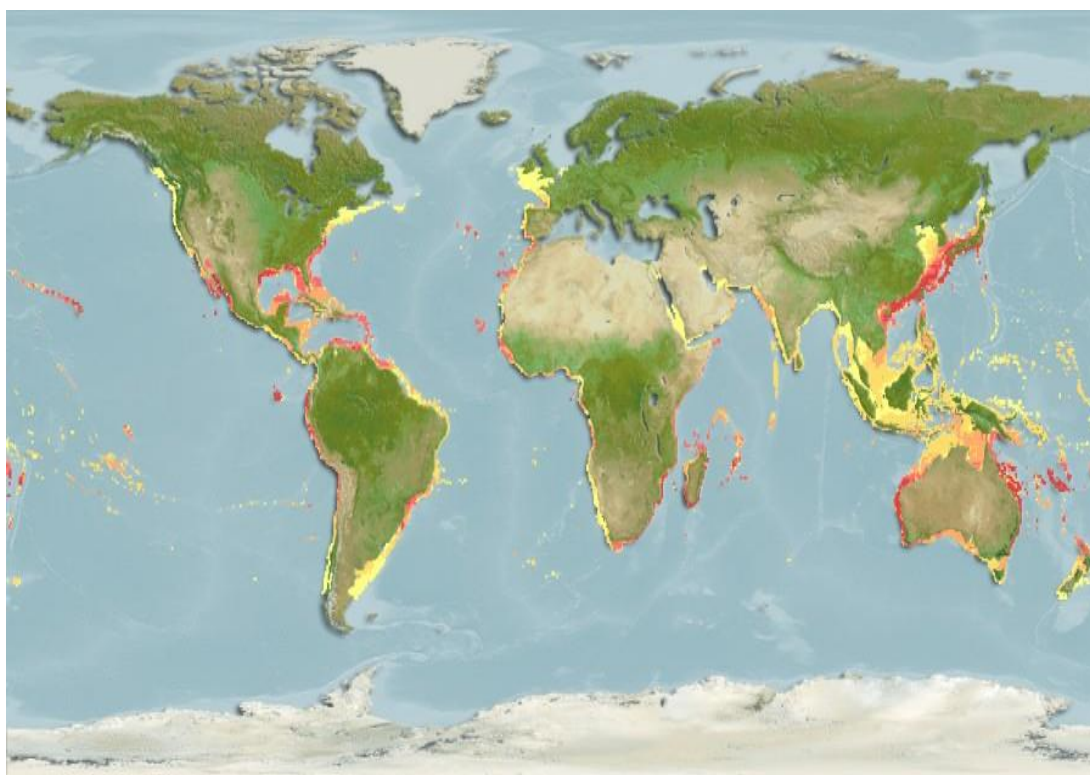
### **2.7 Características morfológicas de jurel *Seriola rivoliana*.**

Los peces del género *Seriola* pertenecen a la familia Carangidae. El Jurel *S. rivoliana* tiene diferentes nombres comunes, como pez fuerte (en Baja California Sur), en inglés se le conoce como también como Almaco Jack, pero principalmente como Longfin yellowtail. Presenta un cuerpo alargado, en promedio alto y poco comprimido (Fig. 7). El perfil dorsal es más convexo que el ventral. El cuerpo presenta colores particulares en la parte superior, costados y vientre que son de color olivo a azulado con reflejos de color violeta claro. Particularmente se caracteriza por tener una franja negra que va desde el ojo hacia el origen de la primera aleta dorsal. En animales adultos se tiene un promedio de 90 cm, con

registros de 1.60 m como talla máxima, mientras que el peso presenta un rango de 15-24 kg (Bussing y López, 2005; Fisher *et al.*, 1995; Smith y Heemstra, 2012).

## 2.8 Distribución geográfica y hábitos ecológicos de jurel *Seriola rivoliana*

El jurel *S. rivoliana* es un pez teleósteo cosmopolita que se encuentra en todos los mares templados, distribuida en zonas tropicales a lo largo del océano Atlántico, Indico Oeste y Pacífico Oeste (Fisher *et al.*, 1995). En el continente americano se halla desde la costa oeste de Estados Unidos hasta Perú, incluido el Golfo de California (Fig. 6). Se asocia a zonas con arrecife, en aguas profundas que van desde los 5 m hasta los 245m, aunque generalmente se le encuentra entre los 5 a 35m (Gasparini y Floeter, 2001). Esta especie se alimenta en el medio natural de moluscos, crustáceos y algunos peces pequeños y su hábitat en los adultos es oceánico y suele ser pelágico y demersal (Fisher *et al.*, 1995).



**Figura 6.** Distribución geográfica (en rojo) de jurel *Seriola rivoliana* (Fish Base).



**Figura 7.** Jurel, *Seriola rivoliana*. Foto por Allen, G. R. y M.V. Erdmann (Fish Base)

Para la especie *Seriola rivoliana* no existen muchos estudios del transcriptoma, sobre todo en el estadio larvario, por lo que es importante evaluar el efecto de la temperatura sobre la expresión de los genes en esta etapa de desarrollo, para determinar si las larvas producidas en el laboratorio tienen la capacidad de llevar a cabo la expresión de todos los genes en eje hipotálamo-pituitaria u ocurre alguna afectación por acuicultura. Este estudio contribuirá a ampliar el conocimiento de esta especie.

### 3. JUSTIFICACION

En México las especies de jurel de género *Seriola* son altamente comercializadas y con un alto valor en el mercado nacional e internacional, ya que son utilizadas en la gastronomía asiática oriental (Avilés-Quevedo y Castelló i Orvay, 2004). Con lo anterior, la captura de esta especie tiene mucha demanda, en donde el estado de Baja California Sur y Baja California aportan el mayor porcentaje de producción en México (SAGARPA, 2010). Baja California Sur se encuentra entre los primeros lugares en actividad pesquera y acuícola a nivel nacional, ya que aquí en el estado se encuentran cinco empresas que se dedican a cultivar estas especies.

En México, y en especial en la región noroeste, se están llevando a cabo esfuerzos para la optimización de las tecnologías y cultivo de peces marinos con potencial económico. Una de las ramas de la acuicultura en donde se está realizando un esfuerzo mayor es en el cultivo larvario, ya que es el cuello de botella de cualquier especie con potencial de cultivo. Debido a la alta mortalidad que presenta en el estado larvario, se hace necesario que se realicen estudios relacionados a su desarrollo, su fisiología en los primeros días, la respuesta inmune, su alimentación, por mencionar algunos. Sin embargo, no se tiene mucha información sobre esta especie en particular, especialmente en la relación que existe entre la temperatura y la expresión de los genes que se encuentran relacionados al metabolismo, desarrollo, crecimiento, formación del esqueleto, pigmentación entre otros. Para la especie *Seriola rivoliana* no existen muchos estudios del transcriptoma, sobre todo en el estadio larvario, por lo que es importante evaluar el efecto de la temperatura sobre la expresión de los genes en esta etapa de desarrollo, para determinar si las larvas producidas en el laboratorio tienen la capacidad de llevar a cabo la expresión de todos los genes en eje hipotálamo-pituitaria o ocurre alguna afectación por acuicultura. Este estudio contribuirá a ampliar el conocimiento de esta especie. Con lo anterior, es necesario incrementar los estudios multidisciplinarios para abarcar toda la gama de



problemas en los cuales se centran las principales causas de mortalidad en estadios temprano de desarrollo. En este trabajo se realizó el estudio del transcriptoma (RNA-seq) de larvas de *Seriola rivoliana* identificando los genes involucrados en el eje tiroideo, los cuales están relacionados con todos los aspectos metabólicos de desarrollo antes mencionados. Adicionalmente, se analizó el efecto de tres temperaturas en la expresión diferencial de los genes identificados en el transcriptoma, durante los primeros tres días de desarrollo larvario. La información generada será de utilidad para conocer la capacidad que tienen las larvas recién eclosionadas de llevar a cabo la expresión de genes del eje tiroideo, aun cuando no se encuentran desarrollados los órganos involucrados en las larvas, o bien, si existe una afectación del eje tiroideo ocasionado por la temperatura.

#### **4. HIPOTESIS**

Si la temperatura influye en el eje hipotálamo-pituitario-tiroides durante el desarrollo de larvas de peces, entonces, habrá una expresión diferencial de genes involucrados en la función tiroidea.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la temperatura sobre la expresión diferencial de los genes involucrados en la función tiroidea en larvas de jurel *Seriola rivoliana*.

### 5.2 Objetivos particulares

1.- Identificar los genes involucrados al eje hipotálamo-pituitaria-tiroides en larvas de *Seriola rivoliana*.

2.- Analizar la expresión diferencial de los genes tiroideos *in silico* durante la eclosión y los primeros cuatro días de desarrollo.

3.- Evaluar la expresión diferencial en tiempo real de los genes del eje hipotálamo-pituitaria-tiroides en los dos primeros días de desarrollo larvario en tres temperaturas (22°C, 26°C y 28°C).

## 6. MATERIAL Y METODOS

### 6.1 Huevos de jurel *Seriola rivoliana*

Los huevos de jurel fueron donados por la empresa Kampachi Farm Mexico en sus instalaciones de planta piloto en el CIBNOR. Los huevos se incubaron en tinas de 200 litros por triplicado a una temperatura de 22 °C durante un periodo de 5 días. Se realizó una extracción de ARN total a partir del día que eclosionaron los huevos (día 0) y los primeros 4 días posteclosión.

### 6.2 Extracción de ARN

La extracción de ARN (200 mg por muestra) para secuenciación en Novogene se realizó mediante el reactivo Tripure (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. La extracción de ARN para qPCR en tiempo real, cada muestra de larvas (200 mg) fue procesada de forma inmediata adicionando 790 µL de buffer de lisis (Tris-HCL 10 mM, EDTA 1mM, NaCl 10 mM), 100 µL de SDS al 10%, y 100 µL de RNA Secure™ 10X (Ambion®, Life Technologies™, USA), previamente activado a 60°C durante 10 minutos. Posteriormente, la digestión proteica del tejido se llevó a cabo añadiendo a cada tubo 40 µL de proteinasa K (20 mg/mL stock), se homogeneizó en vórtex por unos segundos y se incubó a 55 °C hasta la digestión completa del tejido, agitando el tubo en un vortex cada 10 minutos. El homogeneizado obtenido se centrifugó durante tres minutos a 6,000 fuerza centrífuga relativa (fcr, fuerza *g*) y se recuperaron 300 µL del sobrenadante en un nuevo tubo Eppendorf. Al sobrenadante recuperado, se le agregaron 800 µL de solución salina (3.5 M NaCl, 25 mM Citrato de Sodio), 130 µL de ácido acético grado molecular, y se homogeneizó suavemente. Se centrifugó a 14,000 fcr durante 20 minutos a 4 °C y se recuperaron 500 µL de la fase acuosa en un nuevo tubo. Se añadió 0.1 V de acetato de sodio 3 M (50 µL), 1 V de isopropanol absoluto (550 µL) y se invirtió el tubo suavemente para homogeneizar el contenido del tubo. Las muestras se centrifugaron a 14,000 fcr durante 15 minutos a 4 °C, se

decantó el sobrenadante y se realizaron tres lavados con 800  $\mu$ L de etanol al 75%. Las condiciones de centrifugación para realizar los lavados fueron de 14,000 fcr durante 10 minutos a 4 °C. Después del último lavado, se secó el pellet hasta evaporar el etanol a temperatura ambiente y este se disolvió con 30  $\mu$ L de la solución RNA Storage (Ambion®, Life Technologies™, USA) (Vázquez-Islas *et al.*, En Prensa).

### **6.3 Tratamiento con DNasa**

El tratamiento con DNasa se realizó utilizando el kit TURBO DNA-free™ (ThermoFisher Scientific). Se agregaron los reactivos para la digestión del ADN (0.1 V del Buffer 10X Turbo DNasa y 1  $\mu$ L de reactivo) al tubo con ARN y se mezclaron suavemente. Se incubó a 37°C durante 30 minutos, se agregó el reactivo de inactivación de DNasa (0.1 volumen) y se mezcló. Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 10,000 g durante 90 s. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de 0.5 mL (Ambion®, 2013).

### **6.4 Cuantificación e integridad del ARN**

Para las muestras procesadas en el laboratorio de Endocrinología, El ARN se cuantificó en un Nanodrop™ 2000 (Thermo Scientific™, UK) para determinar su pureza y concentración y se verificó que las muestras presentaran una OD260/280 = 1.8 – 2.2 y OD260/230  $\geq$  2.0. La integridad del ARN se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, a 100 V por 30 minutos, en donde la agarosa se incubó con cloro (1% v/v) por 5 min antes de solidificar, para inhibir las ribonucleasas (Aranda *et al.*, 2012). Se utilizó Red gel como colorante y O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific™, Fermentas) como marcador molecular. Para el envío de las muestras a Novogene, se colocó una concentración  $\geq$  2.6  $\mu$ g de ARN de cada muestra de forma independiente en un tubo de RNA stable®/ LD (Biomatrix), los tubos se secaron por una hora en una centrifuga concentradora de vacío (Eppendorf Vacufuge Concentrator) a

temperatura ambiente. En cuanto llegaron la muestras de ARN a Novogene, se resuspendieron en agua libre de nucleasas y se cuantificaron mediante el uso del equipo Agilent 2100.

### **6.5 Construcción de las bibliotecas y secuenciación**

Las muestras de ARN se purificaron de acuerdo a las condiciones necesarias para su secuencias la plataforma de secuenciación Illumina HiSeq™ 2500 (Illumina Inc.) realizada por la empresa Novogene. En el flujo de trabajo para la secuenciación por medio de Illumina®, primero se realizó la purificación del ARNm, que contiene poli-A, empleando perlas magnéticas unidas a un oligo poli-T. Después se realizó una fragmentación del ARNm en pequeñas piezas empleando cationes divalentes a una alta temperatura. Estos fragmentos de ARNm fueron copiados en una primera hebra de ADNc utilizando una transcriptasa reversa y *random primers*, para después sintetizar una segunda hebra de ADNc con una polimerasa I y RNAsa H. Estos fragmentos de ADNc previamente tienen un proceso de reparación en sus extremos, en donde se le adiciona una base “A”, para después realizar la conjugación de los adaptadores. Por último, los productos se purificaron y enriquecieron mediante un PCR para crear las bibliotecas de ADNc, que produjeron un tamaño de inserto de 300-500 pb. Los resultados de la secuenciación (las lecturas absolutas un tamaño de información de 8.5 Gb por muestra

### **6.6 Filtrado y limpieza de secuencias, ensamble *de novo***

Las secuencias en ocasiones pueden arrojar errores de lectura, por lo que se deben remover las que tengan baja calidad. La limpieza de las lecturas para remover los adaptadores, revisar la calidad y longitud de cada lectura se realizó mediante las herramientas Trimmomatic y FastQC, utilizando un filtro de calidad con una Q (phred)  $\geq 20$  y se removieron los adaptadores utilizando la herramienta Trimmomatic con las secuencias estándar reportadas por Illumina. FastQC tiene

como objetivo proporcionar una forma sencilla de realizar algunas verificaciones de control de calidad en los datos de secuencia sin procesar que provienen de los procesos de secuenciación de alto rendimiento. Proporciona un conjunto modular de análisis que puede utilizar para dar una impresión rápida, si sus datos tiene algún problema que deba conocer antes de realizar un análisis adicional. Por otro lado, Trimmomatic además de ayudarnos para el recorte de la lectura y filtrado, nos ayudara a identificar las secuencias de los adaptadores. Este algoritmo utiliza dos enfoques para detectar estos adaptadores y cebadores que se utilizaron. El ensamblaje *de novo* de las lecturas se realizó con el programa Trinity r2014 04 13p1, combinando las lecturas provenientes de las tres librerías por día, utilizando los formatos fastq, y utilizando los siguientes parametros  $K=25$  y  $\text{min kmer cov}=2$ . Después con la herramienta Corset (v1.05) se realizó un filtrado de las lecturas que presentan una baja cobertura (menos de 10 lecturas), esta herramienta realiza el agrupamiento jerarquico para eliminar la redundancia y seleccionar las transcripciones mas largas de cada grupo como unigenes.

## **6.7 Cuantificación de las secuencias**

Para cuantificar la abundancia de los clusters o transcritos se utilizó Salmon 0.13.1. La cuantificación se realizó en dos fases, la primera es creando un índice con el transcriptoma completo el cual servirá de base para la cuantificación de las lecturas. Posteriormente en base a ese índice, se realizó la cuantificación de la abundancia de los cluster o transcritos, utilizando las lecturas generadas por Illumina limpias y filtradas, de los cinco días de desarrollo larvario por triplicado. Se obtiene como resultado una tabla en que contienen el nombre del cluster, la longitud, la longitud efectiva, TPM (Transcripts Per Million) y los números de lecturas.

## 6.8 Análisis de la expresión diferencial

El análisis de la expresión diferencial se realizó con el número de lecturas obtenido por Salmon, con el paquete de software EdgeR (empirical analysis of digital gene expression in R, Bioconductor), este paquete presenta una característica particular, ya sea en su forma clásica o glm (modelo lineal generalizado), en ambos casos utiliza el método Bayesiano empírico, lo cual permite la estimación de la variación biológica incluso en experimentos con pocas réplicas. Como primer paso se realizó el filtrado de los genes, en donde se removieron los genes que presentaron lecturas poco abundantes, posteriormente se realizó la normalización de las muestras y se estimó la dispersión de los datos. Por último, se calculó la expresión diferencial a un valor de  $FDR < 0.05$  (FDR: false discovery recover) para determinar las diferencias significativas entre los niveles de expresión de los días de desarrollo larvario comparados.

Además, calculó el valor FPKM (Fragmentos por Kilobase de secuencia de transcripción por Millones de pares de bases secuenciados). Para realizar la expresión diferencial, se utilizó los valores de los recuentos de las lecturas obtenidas del análisis de expresión génica, y se realizó utilizando el programa para muestras con réplicas biológicas, DESeq 1.12.0 con un valor de  $p_{adj} < 0.05$ .

Para el análisis de enriquecimiento de las secuencias se realizó un Blast contra las siguientes herramientas: GOSep para realizar un análisis de ontología genética, el servidor KOBAS v2.0.12 para anotar nuestro conjunto de genes y obtener las rutas metabólicas. Para la anotación funcional de las secuencias se generó una hoja de cálculo que contiene la anotación de todas las secuencias y se utilizaron las herramientas Diamond v0.8.22 esta realiza un alineamiento en una base de datos de illumina, KAAS r140224 que es un servidor de anotaciones automático de KEGG, esta herramienta nos proporciona anotaciones funcionales de genes utilizando Blast contra la base de datos KEGG GENES, HMMER herramienta que se utiliza para buscar bases de datos de secuencias homologas, para realizar



alineaciones de secuencias y Blast2GO el cual nos generó gráficas para cada librería.

### **6.9 Anotación funcional y análisis de enriquecimiento**

Para el análisis de enriquecimiento de las secuencias se realizó un Blast contra las siguientes herramientas: GOSep para realizar un análisis de ontología genética, el servidor KOBAS v2.0.12 para anotar nuestro conjunto de genes y obtener las rutas metabólicas. Para la anotación funcional de las secuencias se generó una hoja de cálculo que contiene la anotación de todas las secuencias y se utilizaron las herramientas Diamond v0.8.22 esta realiza un alineamiento en una base de datos de illumina, KAAS r140224 que es un servidor de anotaciones automático de KEGG, esta herramienta nos proporciona anotaciones funcionales de genes utilizando Blast contra la base de datos KEGG GENES, HMMER herramienta que se utiliza para buscar bases de datos de secuencias homologas, para realizar alineaciones de secuencias y Blast2GO el cual nos generó gráficas para cada librería.

### **6.10 Incubación de huevos y desarrollo larvario (qPCR)**

Los huevos de jurel fueron obtenidos de la planta piloto de Kampachi Farms en las instalaciones del CIBNOR. Los huevos flotantes y fertilizados se sembraron a una densidad de 300 huevos L<sup>-1</sup> en tinas de 60 y 200 L de capacidad a temperaturas de 22, 26 y 28 °C, por triplicado. Una vez eclosionadas las larvas, se tomaron muestras de cada réplica (día 0) y posteriormente se tomaron muestras al día uno y dos de desarrollo larvario (día 1 y día 2). Cada muestra se pesó en una balanza analítica, obteniendo de 100 a 120 mg de larvas para su inmediato procesamiento para la extracción de ARN. Adicionalmente, en los tanques a 22 °C, las larvas llegaron al día 6 y en ese momento se tomó otra muestra para extracción de ARN.

### 6.11 Expresión relativa y diferencial de genes del eje tiroideo (qPCR)

Con el ARN total, se sintetizó el ADN complementario (ADNc) utilizando el kit cDNA Select iScript™, Oligo dT-20 (Bio-Rad Laboratories), siguiendo las instrucciones del fabricante. El análisis de qPCR se realizó utilizando oligos específicos de los genes del eje hipotálamo-pituitaria-tiroides, diseñados a partir de secuencias parciales (predichas *in silico*) ya reportadas en *Seriola lalandi*, así como los oligos de factor de elongación (EF) como gen de referencia (Tabla II). La mezcla maestra de qPCR fue: 3 µL de cDNA (dilución 1: 5), 0.4 µL de cada oligo (sentido y anti-sentido) a partir de una solución 10 µM stock (0.4 pmol / µL), 5.4 µL de agua libre de nucleasas (Sigma-Aldrich) y 10 µL (1X) SsoFast EvaGreen supermix (Bio-Rad Laboratories); 20 µL de volumen final por reacción. El programa del termo ciclador CFX96 Touch™ (Bio-Rad Laboratories) fue: activación enzimática 98 °C durante 30 s, 40 ciclos a 98 °C, 10 s; 57 °C durante 15 s para alineamiento y extensión, y una curva de separación: 65 a 95 °C en incrementos de 0.5 °C, cada 5 s. Se obtuvo una curva de calibración para cada gen después de mezclar 2 µL de cada muestra, diluirla 1: 5 con agua libre de nucleasas y hacer cinco diluciones seriadas. El valor del umbral de referencia se ajustó en cada curva de calibración, lo que dio como resultado un 100% de eficiencia ( $E = 2$ ) (Rasmussen, 2001), utilizando el CFX Manager 3.0 (Bio-Rad Laboratories). La expresión relativa se calculó mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  (Livak y Schmittgen, 2001), en donde el promedio de la expresión relativa (Cq) de las larvas al momento de la eclosión (día 0) se consideró como el control, mientras que las larvas en los días uno y dos como tratamientos. El doble delta ( $\Delta\Delta$ ) se llevó a cabo mediante dos substracciones: 1) se substrajo el valor Cq del control al del valor Cq de EF control (Cq-control) y en el caso de cada uno de los tratamientos: el valor Cq del tratamiento al del valor Cq de EF tratamiento (Cq-tratamiento) y 2) se substrajo el valor Cq-tratamiento al del Cq-control, y utilizando el método  $2^{-Cq}$ , dando el resultado de la expresión relativa. Posteriormente, la expresión diferencial se obtuvo aplicando logaritmo en base 2.

**Tabla I.** Oligos específicos de los genes del eje hipotálamo-pituitaria-tiroides y factor de elongación diseñados a partir de secuencias parciales (predichas in silico) ya reportadas en *Seriola lalandi*, así como los números de acceso de GenBank.

Oligo	Secuencia 5'-3'	No. Acceso	Producto (bp)
Trh_1F	ccggaagagatacggcgag	XM_023422746.1	129
Trh_1R	tgtgcattcatcttcgct		129
Tsh_2F	accctggcagagcaactac	XM_023430126.1	104
Tsh_2R	tctggatcgtgcagttgtg		104
Tg_2F	ctgagagacaacacaccgct	XM_023396505.1	130
Tg_2R	gacacaccacgtctgaacca		130
Dio1_2F	gaaagacaacagaccgctgg	XM_023407987.1	101
Dio1_2R	cgctgaagtccttgacgagt		101
Dio2_1F	gagcagcacgcaaactcatt	XM_022750768.1	111
Dio2_1R	cccttcattggacacaccg		111
Thra_2F	acttgagcgcgagaatgtga	XM_023406757.1	108
Thra_2R	ctctctacccatgtccgtg		108
Thrb1_2F	gaatcgaacgctgccaagag	XM_023413196.1	115
Thrb1_2R	cgcaagtcgctcaccttcat		115
Eef2_2F	ctggcttatgctgccagtgt	XM_022754861.1	124
Eef2_2R	tctcattgcagcacaggtg		124

## 6.12 Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos de la expresión relativa (qPCR) de cada gen, estos se tuvieron que convertir a  $\log_2$  (Fold-Change). Los datos convertidos se analizaron por separado, a cada conjunto de datos se le

aplicó la prueba de normalidad (Shapiro-Wilk) y la prueba de homogeneidad de varianzas (Levene).

Para corroborar los resultados de la expresión diferencial obtenidos *in silico* con los resultados obtenidos por qPCR a una temperatura de incubación de 22°C. Los datos de qPCR correspondientes a la temperatura de 22°C se analizaron de forma independiente por medio de una ANOVA de una vía. Los resultados obtenidos se compararon con su respectivo día evaluado *in silico*.

Para evaluar diferencias entre las temperaturas de incubación de 22°C, 26°C y 28°C en relación a los días transcurridos de desarrollo larvario se aplicó una ANOVA de dos vías, teniendo como factores a la temperatura de incubación y los días de desarrollo. Cuando se obtuvo un efecto significativo en la expresión génica en cualquiera de los dos factores o en su interacción (un efecto significativo en relación a la temperatura de incubación con los días de desarrollo transcurrido), se aplicó la prueba de Duncan para determinar las diferencias significativas que existe entre las temperaturas de incubación, días de desarrollo o entre ambos factores. Los datos se reportaron como la media  $\pm$  desviación estándar. Para el análisis de todos los datos se usó el programa R paquete stats v3.6.1, con un nivel de significancia de  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  y  $P < 0.001$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Eclosión del desove

El desove que se incubó a tres temperaturas tuvo un porcentaje de eclosión de 85, 85 y 80%, a 22, 26 y 28 °C, respectivamente. No se presentó mortalidad en las larvas en el día 1 y día 2 después de la eclosión.

### 7.2 Identificación de los genes involucrados al eje hipotálamo-pituitaria-tiroides en larvas de *Seriola rivoliana*.

Se identificaron los transcritos directamente relacionados al eje hipotálamo-pituitaria-tiroides en larvas de *Seriola rivoliana*, se realizó la búsqueda de estos por medio del uso de la función diseñada en R desde el transcriptoma ensamblado en el Laboratorio de Endocrinología del CIBNOR, en específico para *S. rivoliana*. Para su búsqueda se usaron como palabras claves los nombres de los genes involucrados en este eje.

Una vez ensamblado el transcriptoma, se obtuvieron 181,214 unigenes, de los cuales, 62 cluster de los unigenes originales estuvieron relacionados con la función tiroidea. Sin embargo, solo se identificaron 53 clusters relacionados al eje hipotálamo-pituitario- tiroides.

En las siguientes tablas se muestran los principales transcritos obtenidos y seleccionados que están directamente involucrados en el eje hipotálamo-pituitaria-tiroides y sus características. Para consultar las secuencias nucleotídicas obtenidas utilizadas en este estudio, véase el Anexo1.

A continuación se muestran cinco clusters relacionados con la palabra clave “*Thyrotropin releasing hormone*”, dentro de los cuales se lograron identificar los transcritos de la hormona liberadora de tirotrópina (*trh*), un receptor de la *trh* (*trhr*), y dos receptores similares al receptor de la *trh* (*trhr-like X1* y *trhr-like X2*) y una enzima degradadora de la *trh* (*trhde*) (Tabla III). El transcrito utilizado para qPCR fue el primero en la tabla.

**Tabla II.** Transcritos identificados de la hormona liberadora de tirotrópina.

Gen	Cluster	Tamaño (bp)	NR ID de la anotación	Identidad (%)	Descripción de la anotación
<i>trh</i>	11888.105 456	510	XM_02342 2746.1	99.804	PREDICTED: <i>Seriola lalandi dorsalis thyrotropin releasing hormone (trh)</i> , mRNA
<i>trhde</i>	11888.186 5	5586	XM_02342 1057.1	97.931	PREDICTED: <i>Seriola lalandi dorsalis thyrotropin releasing hormone degrading enzyme (trhde)</i> , mRNA
<i>trhr</i>	11888.126 79	2509	XM_02341 0446.1	97.47	PREDICTED: <i>Seriola lalandi dorsalis thyrotropin releasing hormone receptor (trhr)</i> , mRNA
<i>trhr-like X1</i>	11888.595 0	731	XM_02340 1011.1	97.177	PREDICTED: <i>Seriola lalandi dorsalis thyrotropin-releasing hormone receptor-like (LOC111651051)</i> , mRNA
<i>trhr-like X2</i>	11888.863 0	1964	XM_02339 7445.1	97.459	PREDICTED: <i>Seriola lalandi dorsalis thyrotropin-releasing hormone receptor-like (LOC111647781)</i> , mRNA

A continuación se muestran los tres clusters relacionados con la palabra clave “*Thyroid stimulating hormone*”, entre estos se identificó un transcrito similar a la subunidad beta de la hormona estimulante de la tiroides (*tshb-like*), un receptor de la *tsh* (*tshr*) y un transcrito similar al receptor de la *tsh* (*tshr-like*) (Tabla IV). El transcrito utilizado para qPCR fue el primero en la tabla

**Tabla III.** Transcritos identificados de la hormona estimulante de la tiroides.

Gen	Cluster	Tamaño (bp)	NR ID de la anotación	Identidad (%)	Descripción de la anotación
<i>tshr</i>	11888.8874	3139	XM_023430126.1	99.064	PREDICTED: <i>Seriola lalandi</i> dorsalis thyroid stimulating hormone receptor ( <i>tshr</i> ), mRNA
<i>tshb-like</i>	11888.7726	1399	XM_022742008.1	99.171	PREDICTED: <i>Seriola dumerili</i> thyrotropin subunit beta-like (LOC111219370), mRNA
<i>tshr-like</i>	40103.2	1863	XM_023412655.1	98.282	PREDICTED: <i>Seriola lalandi</i> dorsalis thyrotropin receptor-like (LOC111659638), mRNA

A continuación se muestra el cluster relacionados a la palabra clave “*Thyroglobulin*”, dentro de esta búsqueda se logró identificar al transcrito que codifica a la tiroglobulina (*tg*) (Tabla V).

**Tabla IV.** Transcrito identificado de tiroglobulina.

<b>Gen</b>	<b>Cluster</b>	<b>Tamaño (bp)</b>	<b>NR ID de la anotación</b>	<b>Identidad (%)</b>	<b>Descripción de la anotación</b>
<i>tg</i>	11888.97947	9473	XM_023396505.1	97.58	PREDICTED: <i>Seriola lalandi</i> dorsalis thyroglobulin ( <i>tg</i> ), mRNA



A continuación se muestran cinco clusters relacionados con la palabra clave “*Thyroid hormone receptor*”, en esta búsqueda se lograron identificar un transcrito del receptor tiroideo alfa (*thra*), dos variantes que anotaron para el receptor tiroideo alfa-B (*thra-B X1* y *thra-B X2*), dos variantes del receptor tiroideo beta (*thrb X1* y *thrb X2*) (Tabla VI). Los transcritos utilizados en qPCR fueron el alfa (*thra-B X2*) y el beta (*thrb X1*), que corresponden al tercero y cuarto en la tabla.

**Tabla V.** Transcritos identificados de receptor tiroideo.

Gen	Cluster	Tamaño (bp)	NR ID de la anotación	Identidad (%)	Descripción de la anotación
<i>thra</i> <i>X1</i>	11888.1 09553	1466	XM_023416 360.1	98.164	PREDICTED: <i>Seriola lalandi</i> dorsalis thyroid hormone receptor alpha (LOC111662483), transcript variant X1, mRNA
<i>thra-B</i> <i>X1</i>	11888.9 9432	671	EF502003.1	92.611	<i>Epinephelus coioides</i> thyroid hormone receptor alpha B protein mRNA, complete cds
<i>thra-B</i> <i>X2</i>	411888. 28635	6081	XM_023406 757.1	98.441	PREDICTED: <i>Seriola lalandi</i> dorsalis thyroid hormone receptor alpha-B (LOC111655389), mRNA
<i>thrb</i> <i>X1</i>	11888.8 2511	3639	XM_023413 196.1	99.112	PREDICTED: <i>Seriola lalandi</i> dorsalis thyroid hormone receptor beta (LOC111660071), transcript variant X3, mRNA
<i>thrb</i> <i>X2</i>	11888.3 6743	1633	XM_022757 263.1	99.51	PREDICTED: <i>Seriola dumerili</i> thyroid hormone receptor beta ( <i>thrb</i> ), transcript variant X3, mRNA

A continuación se muestran cuatro clusters relacionados a la palabra clave “*deiodinase*” (Tabla VII). En esta búsqueda se logró identificar los transcritos que codifican para las enzimas deiodinasa 1 (*dio1*), deiodinasa 2 (*dio2*), deiodinasa 3 (*dio3*), y otro transcrito similar a la deiodinasa 3 (*dio3-like*). Los transcritos utilizados en qPCR fueron la *dio1* y *dio 2*.

**Tabla VI.** Transcritos identificados de deiodinasas.

Gen	Cluster	Tamaño (bp)	NR ID de la anotación	Identidad (%)	Descripción de la anotación
<i>dio1</i>	11888.614 21	2834	XM_02340 7987.1	98.668	PREDICTED: <i>Seriola lalandi dorsalis</i> iodothyronine deiodinase 1 ( <i>dio1</i> ), mRNA
<i>dio2</i>	11888.141 06	2432	XM_02275 0768.1	99.434	PREDICTED: <i>Seriola dumerilli</i> iodothyronine deiodinase 2 ( <i>dio2</i> ), mRNA
<i>dio3</i>	11888.114 277	1521	XM_02275 0821.1	99.923	PREDICTED: <i>Seriola dumerilli</i> iodothyronine deiodinase 3 ( <i>dio3</i> ), mRNA
<i>dio3-like</i>	11888.663 14	1254	XM_02343 0003.1	99.92	PREDICTED: <i>Seriola lalandi dorsalis</i> Iodothyronine deiodinase 3 -like (LOC111672563), mRNA

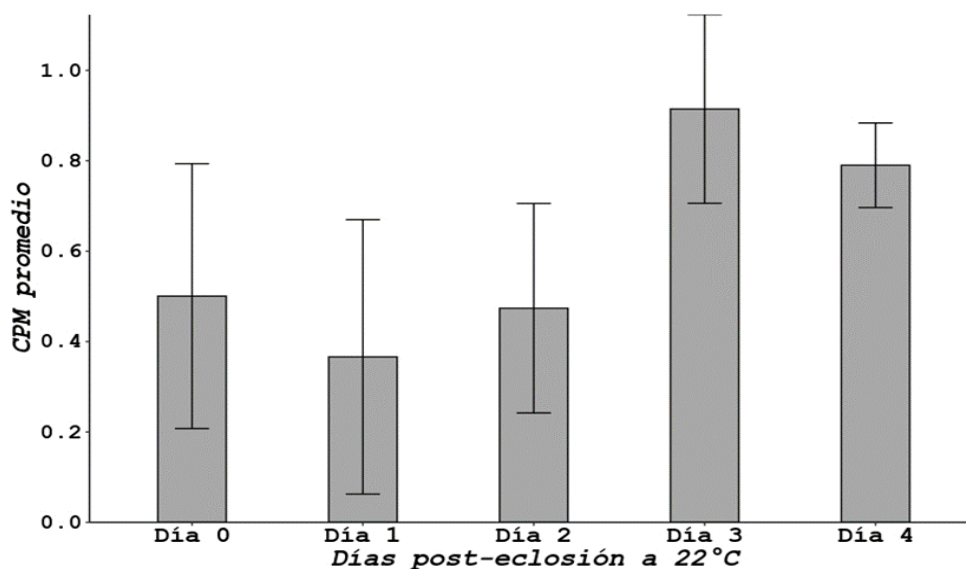
### **7.3 Evaluación de la expresión *in silico* y en tiempo real de los transcritos involucrados al eje hipotálamo-pituitaria-tiroides durante los dos primeros días de desarrollo a tres diferentes temperaturas (22, 26 y 28 °C) de incubación.**

De los principales genes relacionados al eje hipotálamo-pituitaria-tiroides se seleccionaron aquellos que estaban directamente involucrados en el eje y que además presentaron un mayor conteo por millón (cpm). Este criterio se aplicó principalmente a los transcritos con variantes génicas.

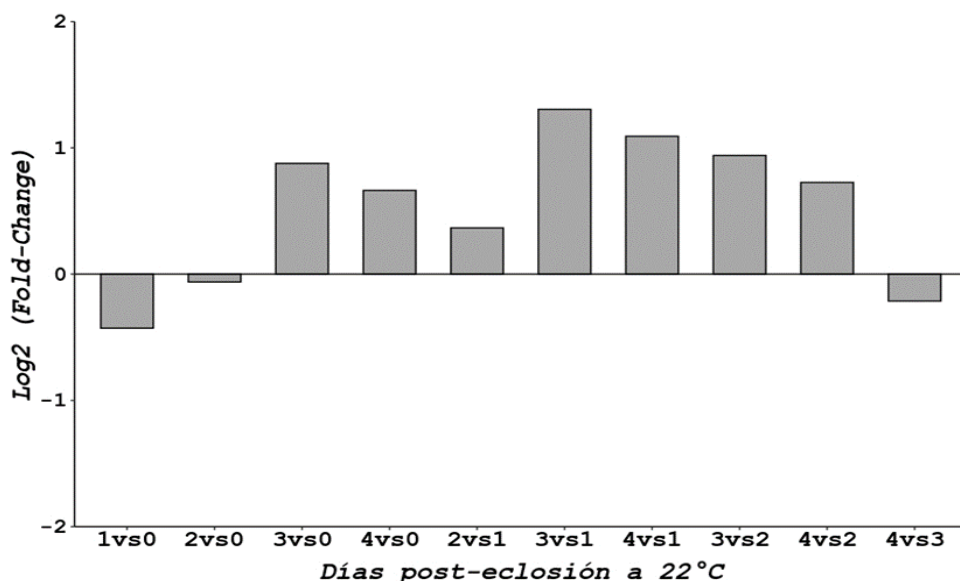
A continuación se describe de forma individual los resultados de los genes evaluados en su expresión génica *in silico* y por qPCR a diferentes temperaturas de incubación 22 °C, 26 °C y 28 °C de las larvas:

#### **7.3.1 Transcrito hormona liberadora de tiotropinas: *trh***

Los resultados *in silico* del transcrito *trh* a una temperatura de 22°C, indicaron que existió una disminución en el conteo del transcrito desde el día cero post-eclosión (0.5 cpm  $\pm$  0.29 S.D.) al día uno (0.36 cpm  $\pm$  0.3 S.D.). Posteriormente al día dos (0.47 cpm  $\pm$  0.23 S.D.) inició la transcripción del transcrito hasta llegar a su máximo valor al día tres (0.91cpm  $\pm$  0.2 S.D.) (Fig. 8). Sin embargo, este incremento no fue significativo. En general se pudo observar que no existieron cambios significativos en la proporciones (Log<sub>2</sub> Fold-Change) del transcrito *trh* a través de los cuatro días transcurridos post-eclosión a una temperatura de incubación de 22°C (Fig. 9).

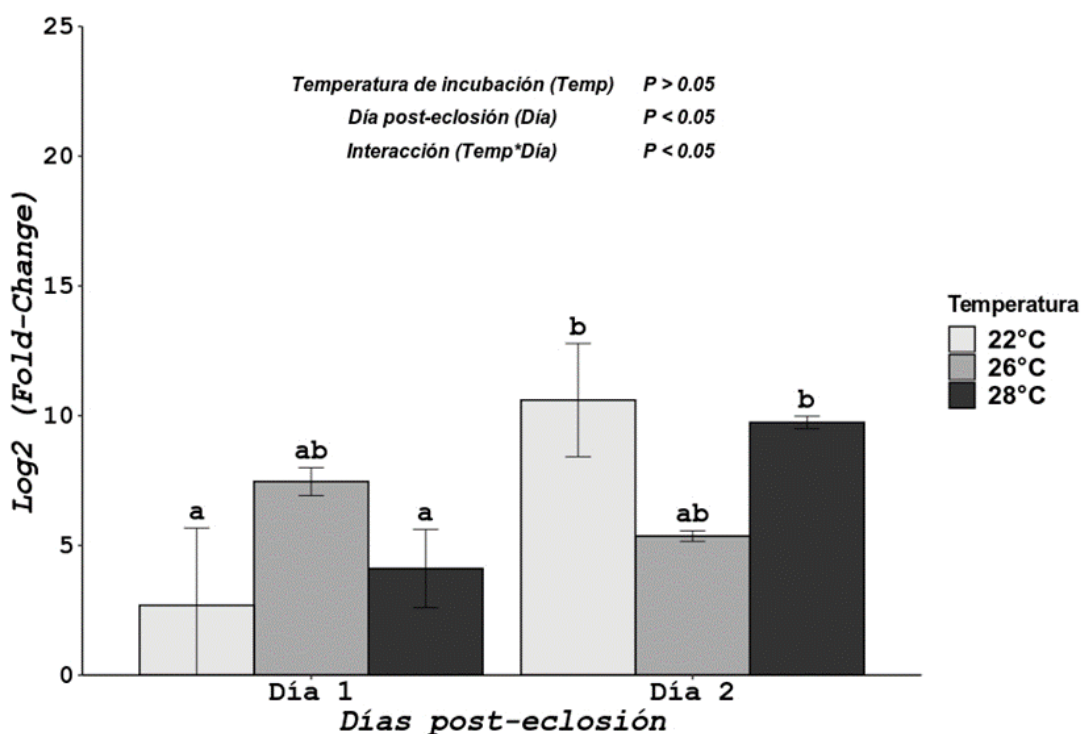


**Figura 8.** Cuantificación del transcrito de la hormona liberadora de tirotrópina (trh), en la eclosión (día 0) y durante los primeros cuatro días de desarrollo a una temperatura de incubación de 22°C (CPM: conteos por millón). Las barras indican la desviación estándar.



**Figura 9.** Expresión diferencial *in silico* del transcrito de la hormona liberadora de tirotrópina (trh); comparación entre los primeros cinco días de desarrollo larvario a una temperatura de incubación de 22°C.

En los resultados de qPCR para la temperatura de 22 °C, cuando se analizaron de forma independiente, no se observó un incremento significativo en la expresión del transcrito *trh* entre los días uno y dos de desarrollo larvario ( $P > 0.05$ ), este resultado fue similar a los resultados obtenidos *in silico* en la expresión diferencial *in silico* ( $FDR > 0.05$ ). En el análisis de la ANOVA de dos vías, se observó el efecto de la temperatura sobre la expresión del gen *trh* a través de los días de desarrollo larvario. Los resultados mostraron que no existieron diferencias significativas entre la expresión del transcrito *trh* evaluado a las diferentes temperaturas de incubación de la larvas (22 °C= 6.09 Log<sub>2</sub> Fold-Change  $\pm$  2.41 S.E., 26 °C= 6.41 Log<sub>2</sub> Fold-Change  $\pm$  0.477 S.E., 28 °C= 6.93 Log<sub>2</sub> Fold-Change  $\pm$  1.28 S.E.,  $P > 0.05$ ). Sin embargo, la expresión del gen *trh* en el día dos fue significativamente mayor (8.39 Log<sub>2</sub> Fold-Change  $\pm$  0.898 S.E.) que la expresión en el día uno (4.75 Log<sub>2</sub> Fold-Change  $\pm$  1.19 S.E), ( $P < 0.05$ ). Además, se presentó un efecto de la temperatura sobre la expresión del gen *trh* dependiente de los días transcurridos de desarrollo larvario ( $P < 0.05$ ). El análisis PostHoc de la interacción temperatura y días de desarrollo, reveló que la expresión del transcrito *trh* del día uno a 22°C (2.69 Log<sub>2</sub> Fold-Change  $\pm$  2.98 S.E.) fue significativamente menor que la expresión en el día dos a 22°C (10.6 Log<sub>2</sub> Fold-Change  $\pm$  2.18 S.E.) ( $P < 0.01$ ) y que en el día dos a 28°C (9.74 Log<sub>2</sub> Fold-Change  $\pm$  0.239 S.E), ( $P < 0.01$ ). También fue menor la expresión del transcrito en el día uno a 28°C (4.11 Log<sub>2</sub> Fold-Change  $\pm$  1.51 S.E.), comparada con la expresión del transcrito *trh* en el día dos a 22°C (10.6 Log<sub>2</sub> Fold-Change  $\pm$  2.18 S.E.), ( $P < 0.05$ ) y en el día dos a 28°C (9.74 Log<sub>2</sub> Fold-Change  $\pm$  0.239 S.E.), ( $P < 0.05$ ) (Fig. 10).

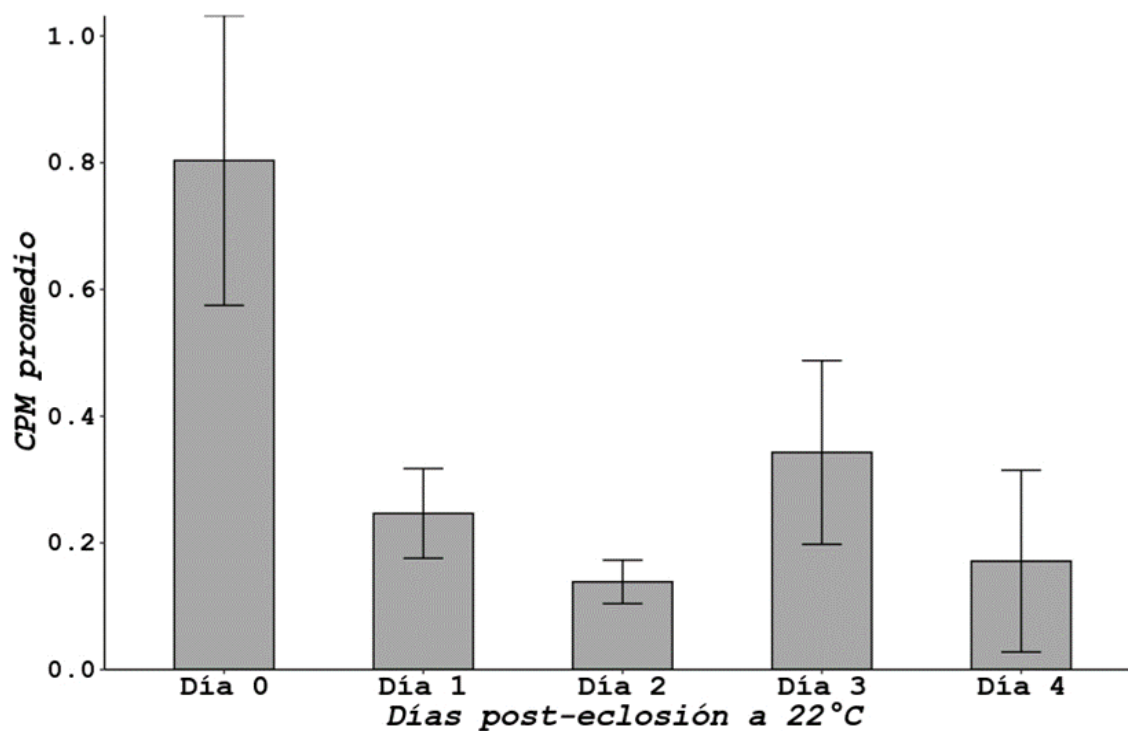


**Figura 10.** Comparación de la expresión relativa del transcrito de la hormona liberadora de tirotrópina (trh) ( $\text{Log}_2$  Fold-Change) de los días uno y día dos a tres diferentes temperatura de incubación de 22°C, 26°C y 28°C (qPCR). Las barras indican el error estándar (S.E.). Las letras diferentes en minúsculas denotan diferencias significativas entre los días y temperaturas evaluadas

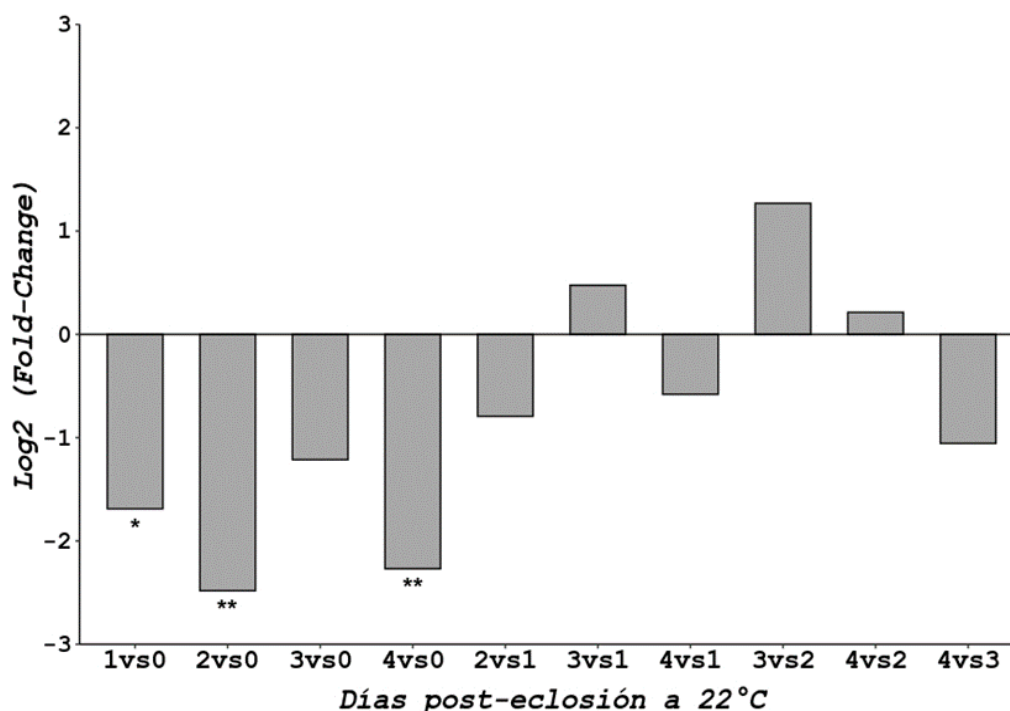
### 7.3.2 Transcrito hormona estimulante de la tiroides *tshb-like*

Los resultados *in silico* mostraron una fuerte disminución en el conteo el transcrito *tshb-like* en el día cero (0.8 cpm  $\pm$  0.22 S.D.), hasta llegar a su nivel más bajo al día dos (0.13 cpm  $\pm$  0.03 S.D.). Posteriormente al día tres existió un ligero incremento de la expresión del transcrito *tshb-like* (0.34 cpm  $\pm$  0.23 S.D.), para posteriormente volver a disminuir hasta a un valor de 0.17 cpm  $\pm$  0.14 S.D (Fig. 11). Se pudo apreciar una disminución significativa en el cambio en la proporción ( $\text{Log}_2$  Fold-Change) de la expresión del transcrito *tshb-like* cuando se comparan los días posteriores a la eclosión con el día cero, excepto el día tres comparado

con el día cero; las otras comparaciones entre los otros días post-eclosión (uno, dos, tres y cuatro) no fueron significativas (Fig. 12).



**Figura 11.** Cuantificación del transcrito de la hormona estimulante de la tiroides (tshb-like), durante los primeros 5 días de desarrollo a una temperatura de incubación de 22°C (CPM: conteos por millón). Las barras indican la desviación estándar.

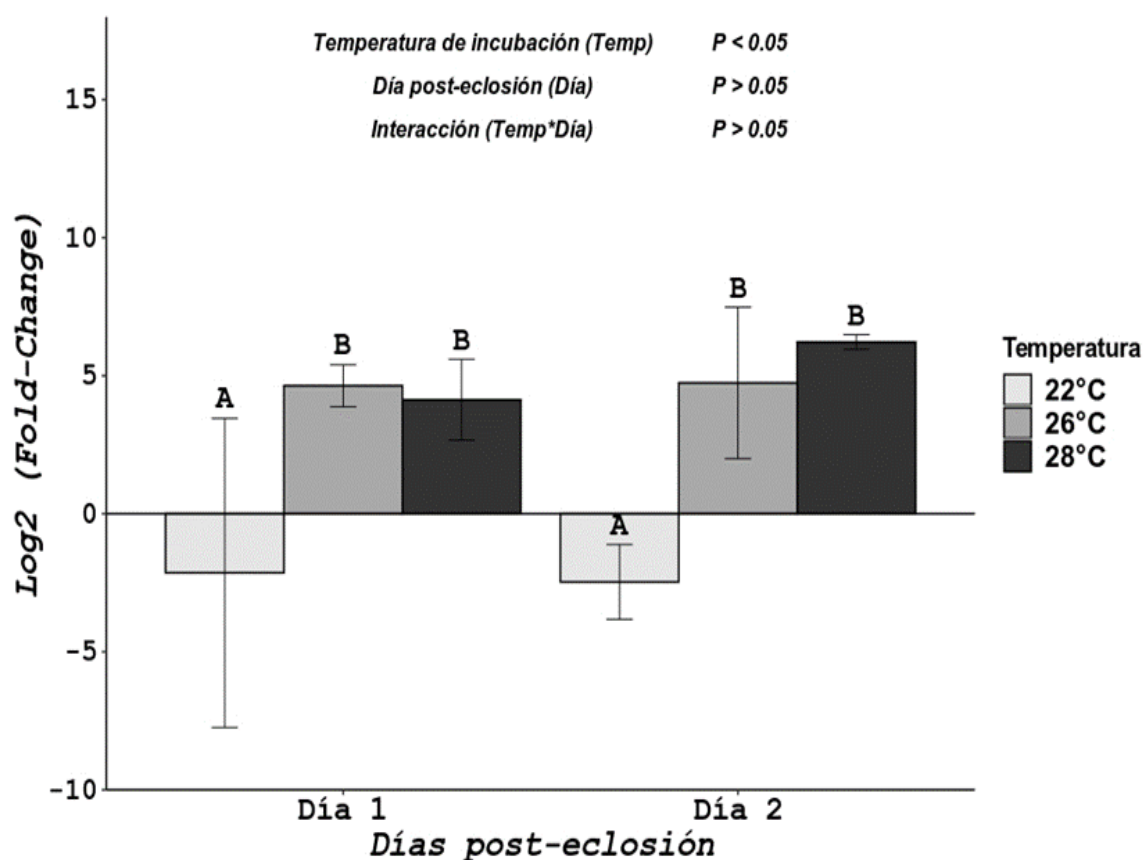


**Figura 12.** Expresión diferencial in silico del transcrito de la hormona estimulante de la tiroides (*tshb-like*), comparación entre los primeros cinco días de desarrollo larvario a una temperatura de incubación de 22°C. Los asteriscos denotan diferencia significativa entre los días evaluados. \*  $FDR < 0.05$ , \*\*  $FDR < 0.01$ , \*\*\*  $FDR < 0.001$ .

En los resultados de qPCR para la temperatura de 22 °C que se analizaron de forma independiente, no se observó ningún cambio en la expresión del gen *tshb-like* cuando se comparó el día dos contra el día uno ( $P > 0.05$ ); para el caso de los resultados *in silico*. Tampoco hubo una diferencia significativa cuando se comparó el día dos contra el día uno ( $FDR > 0.05$ ) (Fig. 13). En el análisis de la ANOVA de dos vías, se observó que existe un efecto de la temperatura de incubación de las larvas sobre la expresión del gen *tshb-like* a través de los días ( $P < 0.05$ ). El análisis PostHoc reveló que la expresión de la *tshb-like* a 22°C (-2.3 Log<sub>2</sub> Fold-Change ± 2.67 S.E.) fue significativamente menor que la expresión del gen a 26°C (4.69 Log<sub>2</sub> Fold-Change ± 1.31 S.E.) ( $P < 0.05$ ) y a 28°C (5.18 Log<sub>2</sub> Fold-Change ±



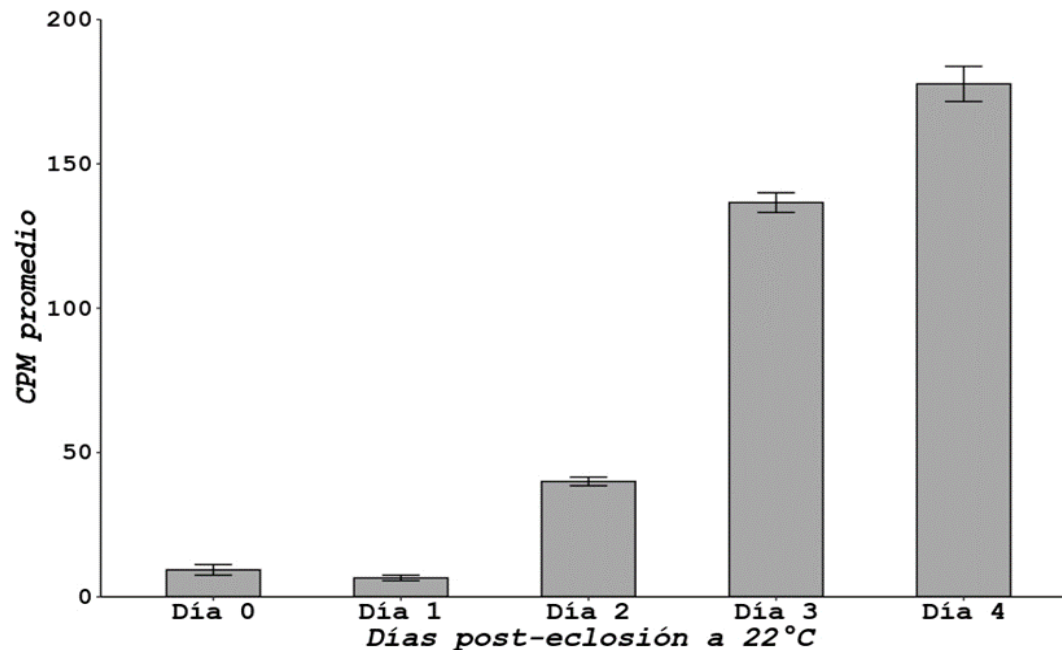
0.79 S.E.) ( $P < 0.05$ ). Por otro lado, no se presentaron diferencias significativas de la expresión del gen *tshb-like* entre el día uno (2.21 Log<sub>2</sub> Fold-Change  $\pm$  1.99 S.E.) y el día dos (2.83 Log<sub>2</sub> Fold-Change  $\pm$  1.47 S.E.), ( $P > 0.05$ ). Adicionalmente, no hubo una interacción significativa entre el efecto de la temperatura y los días transcurridos post-eclosión ( $P > 0.05$ ) sobre la expresión de gen *tshb-like* (Fig. 13).



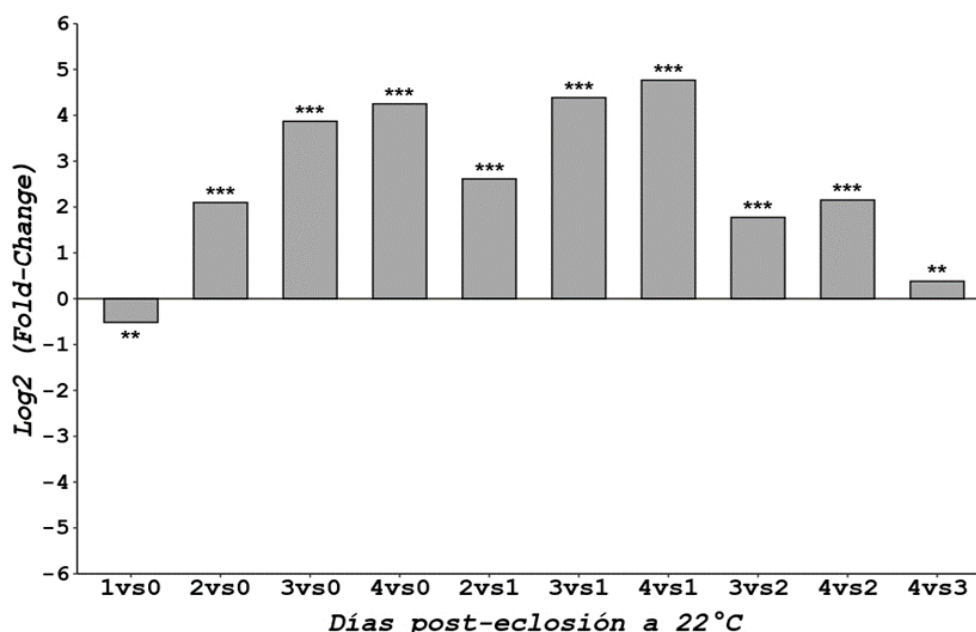
**Figura 13.** Comparación de la expresión relativa del transcrito de la hormona estimulante de la tiroides (*tshb-like*) (Log<sub>2</sub> Fold-Change) de los días uno y día dos a tres diferentes temperatura de incubación de 22°C, 26°C y 28°C (qPCR). Las barras indican el error estándar (S.E.). Las letras diferentes en mayúsculas denotan diferencias significativas entre el grupo de temperaturas evaluadas.

### 7.3.3 Transcrito tiroglobulina: *tg*

Los resultados *in silico* durante los primeros dos días de desarrollo a 22 °C, mostraron un bajo conteo de transcritos de *tg* en el día cero (9.35 cpm  $\pm$  1.84 S.D.) y en el día uno (6.54 cpm  $\pm$  0.95 S.D.), en el día dos experimentó un incremento en la transcripción del transcrito (39.97 cpm  $\pm$  3.41 S.D.). Posteriormente conforme transcurrieron los días de desarrollo se observó un incremento hasta llegar a su mayor conteo al cuarto día (177.68  $\pm$  6.08 S.D), (Fig. 14). Los resultados de expresión diferencial indica que existió una disminución significativa en la proporción (Log<sub>2</sub> Fold-Change) de la expresión del transcrito *tg* cuando se comparó el día uno contra el día cero ( $FDR < 0.01$ ). Posteriormente en los otros días se puede observar en forma general un incremento en la expresión de *tg* ( $FDR < 0.001$  y  $FDR < 0.01$ ), cuando se comparó la expresión del transcrito entre los días de desarrollo larvario a 22 °C (Fig. 15).



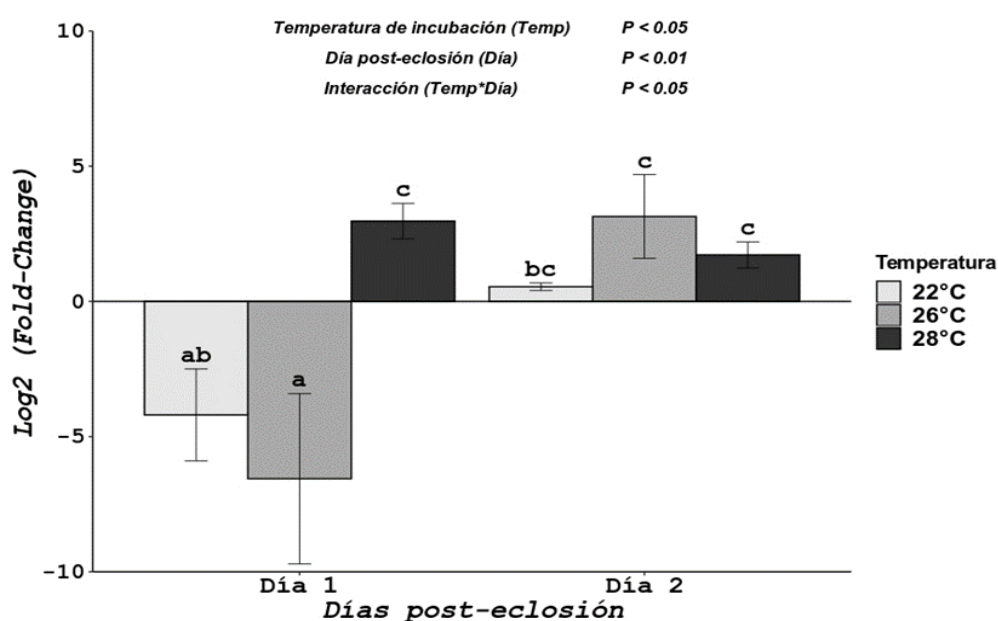
**Figura 14.** Cuantificación del transcrito de tiroglobulina (*tg*), durante los primeros 5 días de desarrollo a una temperatura de incubación de 22°C (CPM: conteos por millón). Las barras indican la desviación estándar.



**Figura 15.** Expresión diferencial *in silico* del transcrito de tiroglobulina (*tg*), comparación entre los primeros cinco días de desarrollo larvario a una temperatura de incubación de 22°C. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre los días evaluados. \*  $FDR < 0.05$ , \*\*  $FDR < 0.01$ , \*\*\*  $FDR < 0.001$ .

En los resultados de qPCR para la temperatura de 22 °C, cuando se analizaron de forma independiente, se observó un incremento significativo de la expresión del transcrito *tg* en el día dos respecto al día uno ( $P < 0.05$ ); para el caso de los resultados *in silico* también se observa un incremento significativo del transcrito cuando se comparó el día dos contra el día uno ( $FDR < 0.001$ ). En el análisis de la ANOVA de dos vías, se observó un efecto de la temperatura de incubación de las larvas sobre la expresión del gen *tg* ( $P < 0.05$ ). El análisis PostHoc reveló que la expresión de la *tg* a 22°C (-1.83 Log<sub>2</sub> Fold-Change  $\pm$  1.31 S.E.) y a 26°C (-1.71 Log<sub>2</sub> Fold-Change  $\pm$  2.68 S.E.), fueron significativamente menores que la expresión del gen a 28°C (2.34 Log<sub>2</sub> Fold-Change  $\pm$  0.459 S.E.) ( $P < 0.001$ ). Adicionalmente, cuando se evaluó el efecto del tiempo de desarrollo, se observó un incremento significativo en la expresión del gen *tg* en el día dos (1.80 Log<sub>2</sub>

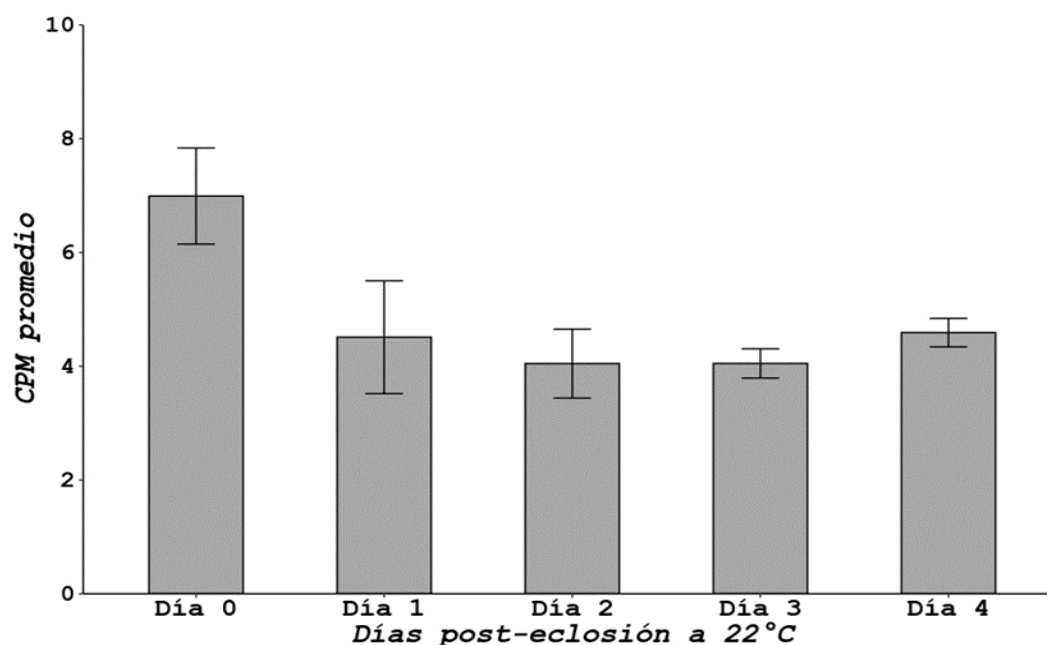
Fold-Change  $\pm$  0.601 S.E.) comparado con el día uno (-2.60 Log<sub>2</sub> Fold-Change  $\pm$  1.78 S.E.), ( $P < 0.05$ ). También se presentó una interacción significativa entre el efecto de la temperatura y los días transcurridos post-eclosión ( $P < 0.05$ ) sobre la expresión de gen *tg* (Fig. 16). En el análisis postHoc se corroboró que la expresión del gen *tg* en el día uno a 22°C (-4.20 Log<sub>2</sub> Fold-Change  $\pm$  1.70 S.E.) fue significativamente menor que en los días uno a 28 °C (2.97 Log<sub>2</sub> Fold-Change  $\pm$  0.654), ( $P < 0.05$ ), en el día dos a 26 °C (3.14 Log<sub>2</sub> Fold-Change  $\pm$  1.55), ( $P < 0.05$ ) y en el día dos a 28 °C (1.72 Log<sub>2</sub> Fold-Change  $\pm$  0.482), ( $P < 0.05$ ). También la expresión del gen *tg* en el día uno a 26 °C (-6.56 Log<sub>2</sub> Fold-Change  $\pm$  3.15 S.E.) fue significativamente menor que la expresión en el día uno a 28 °C (2.97 Log<sub>2</sub> Fold-Change  $\pm$  0.65), en el día dos a 22 °C (0.543 Log<sub>2</sub> Fold-Change  $\pm$  0.138), en el día dos a 26 °C (3.14 Log<sub>2</sub> Fold-Change Log<sub>2</sub> Fold-Change  $\pm$  1.55), y en el día dos a 28 °C (1.72 Log<sub>2</sub> Fold-Change  $\pm$  0.482), ( $P < 0.01$ ), (Fig. 16).



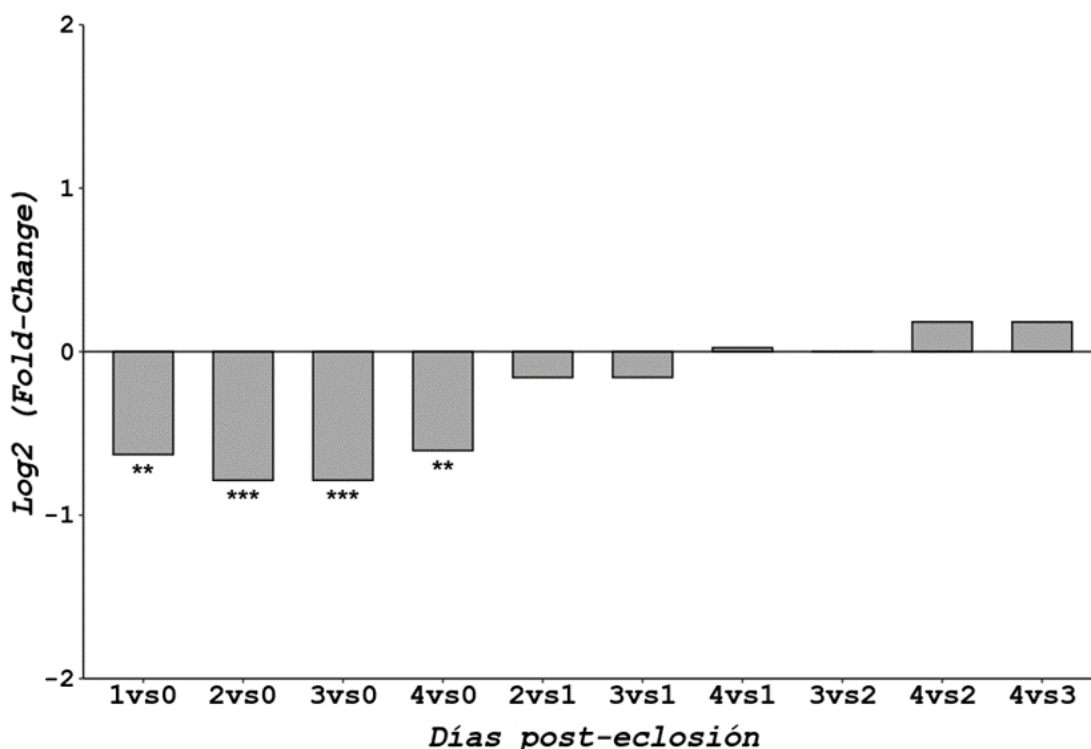
**Figura 16.** Comparación de la expresión relativa del transcrito de tiroglobulina (*tg*) (Log<sub>2</sub> Fold-Change) de los días uno y día dos a tres diferentes temperatura de incubación de 22°C, 26°C y 28°C (qPCR). Las barras indican el error estándar (S.E.). Las letras diferentes en minúsculas denotan diferencias significativas entre las temperaturas evaluadas.

### 7.3.4 Transcrito deiodinasa tipo 1: *dio1*

Los resultados *in silico* mostraron una disminución de los conteos por millón (cpm) del transcrito *dio1* desde el día cero (6.99 cpm  $\pm$  0.84 S.D.) a los días posteriores de desarrollo; después del día cero los conteos se mantuvieron estables en un promedio de 4.29 cpm  $\pm$ 0.52 S.D. (Fig. 17). Los resultados de expresión diferencial indicaron una disminución significativa en la proporción (Log<sub>2</sub> Fold-Change) de la expresión del transcrito *dio1* cuando se compararon los días posteriores de desarrollo contra el día cero ( $FDR < 0.01$  y  $FDR < 0.001$ ). Sin embargo, no existieron diferencias significativas entre las comparaciones de los días posteriores a la post-eclosión en la expresión del transcrito *dio1* ( $FDR > 0.05$ ) (Fig. 18).

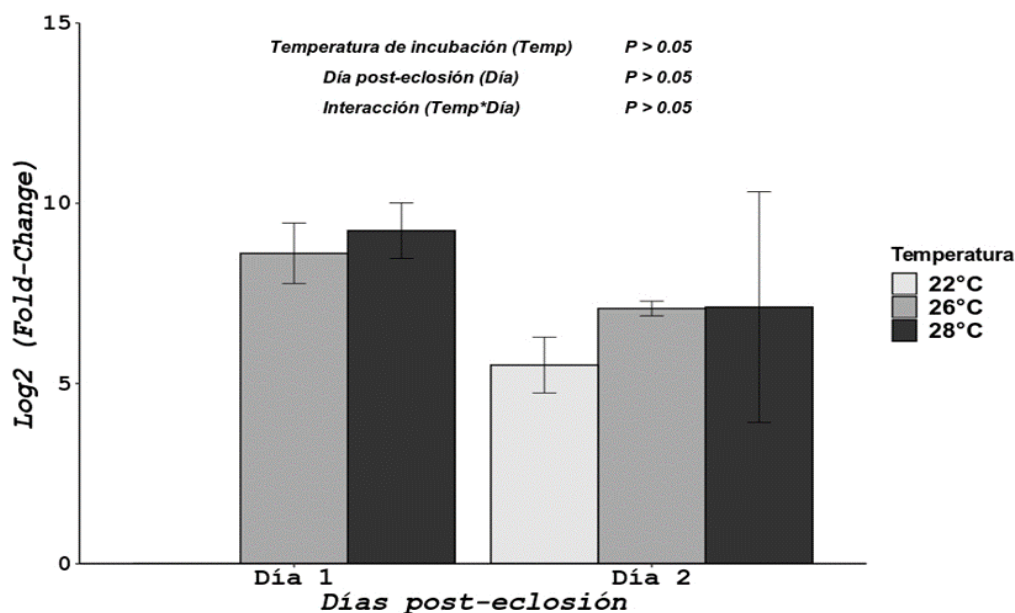


**Figura 17.** Cuantificación del transcrito deiodinasa 1 (*dio1*), durante los primeros 5 días de desarrollo a una temperatura de incubación de 22°C (CPM: conteos por millón). Las barras indican la desviación estándar.



**Figura 18.** Expresión diferencial in silico del transcrito de deiodinasa 1 (*dio1*), comparación entre los primeros cinco días de desarrollo larvario a una temperatura de incubación de 22°C. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre los días evaluados. . \*  $FDR < 0.05$ , \*\*  $FDR < 0.01$ , \*\*\*  $FDR < 0.001$ .

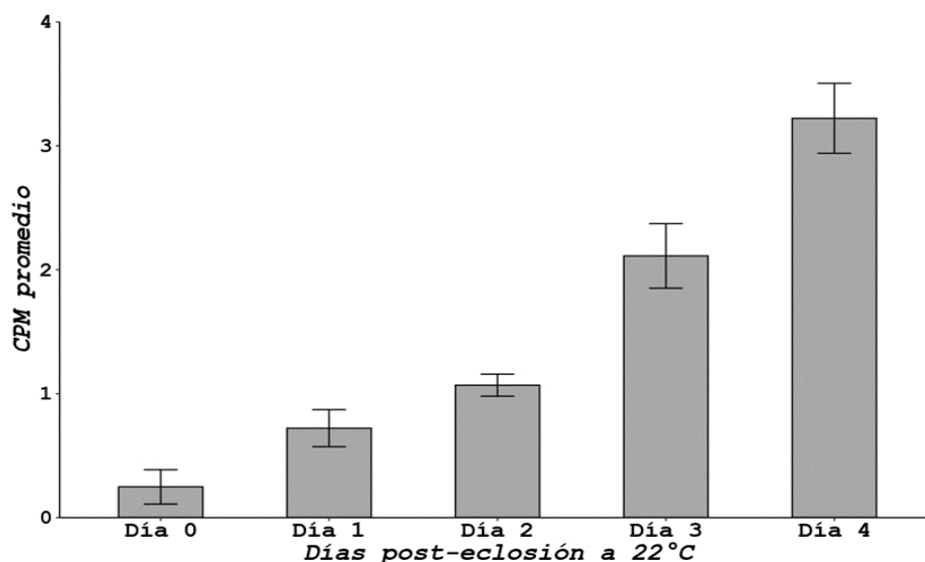
En los resultados de qPCR que se analizaron mediante una ANOVA de dos vías, se observó que no existió un efecto de la temperatura de incubación de las larvas sobre la expresión del gen *dio1* (22 °C: 5.51 Log<sub>2</sub> Fold-Change ± 0.776 S.E., 26 °C: 7.85 Log<sub>2</sub> Fold-Change ± 0.49 S.E. y 28 °C: 8.18 Log<sub>2</sub> Fold-Change ± 1.58 S.E.), ( $P > 0.05$ ). Adicionalmente, no se presentaron diferencias significativas en la expresión del gen *dio1* entre el día uno (8.92 Log<sub>2</sub> Fold-Change ± 0.54 S.E.) y el día dos (6.57 Log<sub>2</sub> Fold-Change ± 1.02 S.E.), ( $P > 0.05$ ). Adicionalmente, no se presentó un efecto significativo entre la temperatura de incubación y los días de desarrollo larvario ( $P > 0.05$ ) (Fig.19).



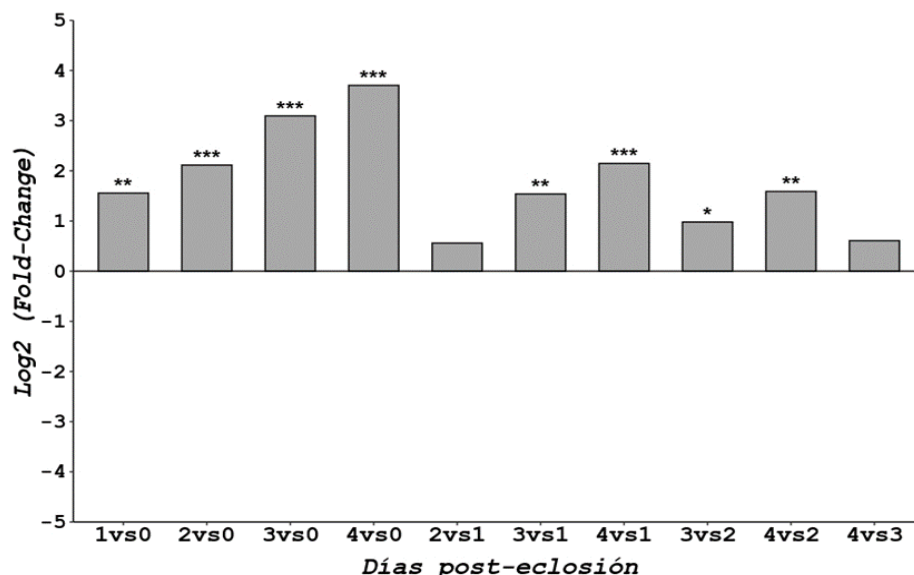
**Figura 19.** Comparación de la expresión relativa del transcrito de deiodinasa 1 (*dio1*) (Log<sub>2</sub> Fold-Change) de los días uno y día dos a tres diferentes temperatura de incubación de 22°C, 26°C y 28°C (qPCR). Las barras indican el error estándar (S.E.).

### 7.3.5 Transcrito deiodinasa tipo 2: *dio2*

Los resultados *in silico* mostraron un incremento escalonado de los conteos por millón (cpm) del transcrito *dio2* desde el día cero (0.24 cpm  $\pm$  0.13 S.D.), en el día uno (0.72 cpm  $\pm$  0.14 S.D.), en el día dos (1.06 cpm  $\pm$  0.08 S.D.), en el día tres (2.11 cpm  $\pm$  0.26 S.D.), y en el cuarto día (3.22 cpm  $\pm$  0.28 S.D.), (Fig. 20). Los resultados de expresión diferencial indicaron un incremento significativo en la proporción (Log<sub>2</sub> Fold-Change) de la expresión del transcrito *dio2* cuando se compararon los días posteriores de desarrollo contra el día cero ( $FDR < 0.01$  y  $FDR < 0.001$ ). Adicionalmente, existió un incremento significativo de los días posteriores a la eclosión respecto a los otros días, con excepción de la expresión del *dio2* en el día dos contra el día uno, y el cuarto día contra la expresión del día tres, sin embargo, en ambos casos no existió un incremento no significativo ( $FDR > 0.05$ ) (Fig. 21).



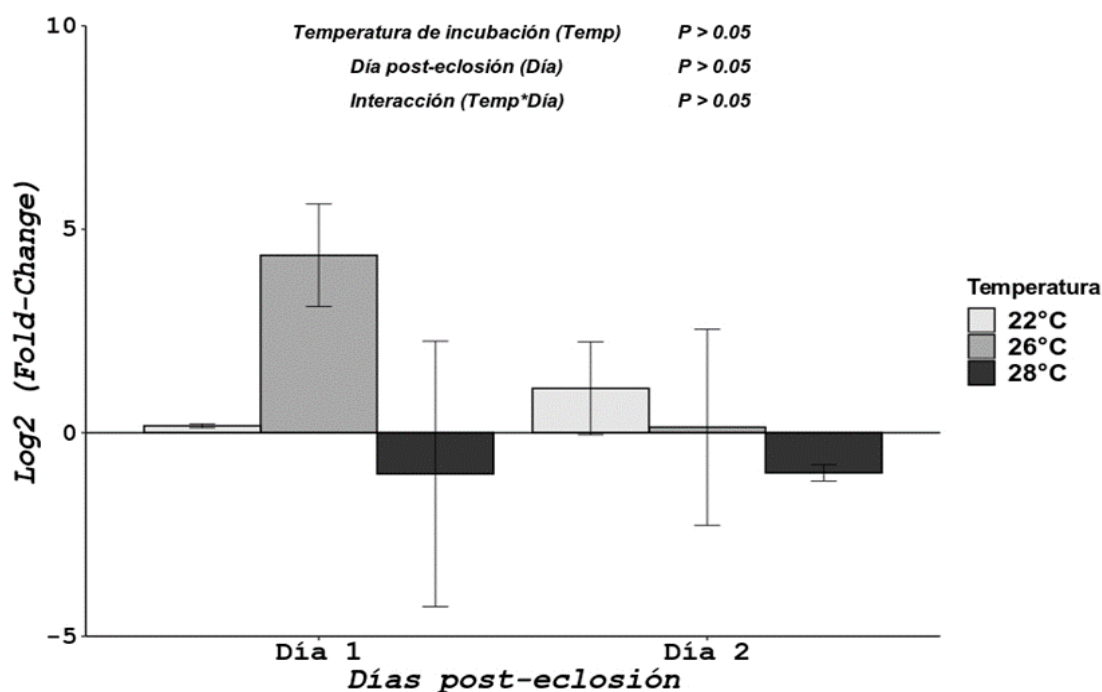
**Figura 20.** Cuantificación del transcrito deiodinasa 1 (dio1), durante los primeros 5 días de desarrollo a una temperatura de incubación de 22°C (CPM: conteos por millón). Las barras indican la desviación estándar.



**Figura 21.** Expresión diferencial in silico del transcrito de deiodinasa 2 (dio2), comparación entre los primeros cinco días de desarrollo larvario a una temperatura de incubación de 22°C. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre los días evaluados. \*  $FDR < 0.05$ , \*\*  $FDR < 0.01$ , \*\*\*  $FDR < 0.001$ .



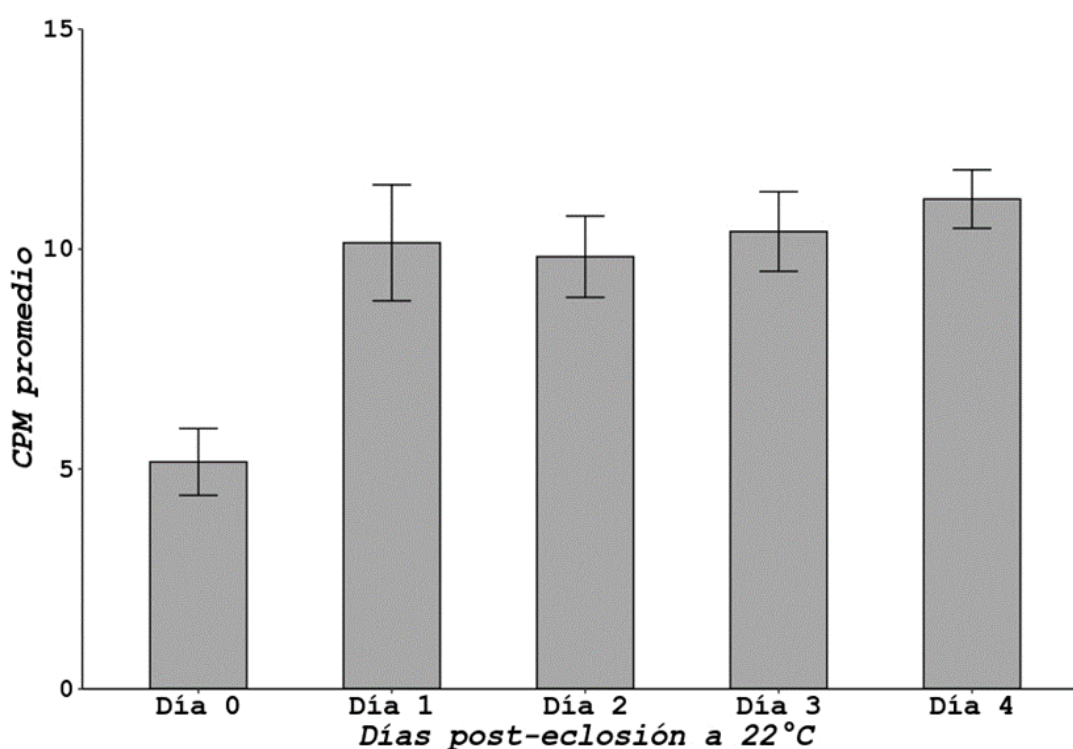
En los resultados de qPCR para la temperatura de 22 °C, cuando se analizaron de forma independiente, no se observó un incremento significativo de la expresión del gen *dio2* en el día dos respecto al día uno ( $P > 0.05$ ); este resultado fue similar que el obtenido *in silico*. En los resultados de qPCR que se analizaron mediante una ANOVA de dos vías, se observó que no existió un efecto de la temperatura de incubación de las larvas sobre la expresión del gen *dio2* (22 °C: 0.56 Log<sub>2</sub> Fold-Change  $\pm$  0.47 S.E., 26 °C: 0.94 Log<sub>2</sub> Fold-Change  $\pm$  1.67 S.E. y 28 °C: -0.99 Log<sub>2</sub> Fold-Change  $\pm$  1.74 S.E.), ( $P > 0.05$ ). Adicionalmente, no se presentaron diferencias significativas en la expresión del gen *dio2* entre el día uno (0.95 Log<sub>2</sub> Fold-Change  $\pm$  1.2 S.E.) y el día dos (-0.69 Log<sub>2</sub> Fold-Change  $\pm$  1.07 S.E.), ( $P > 0.05$ ), ni tampoco entre la temperatura de incubación y los días de desarrollo larvario ( $P > 0.05$ ) (Fig. 22).



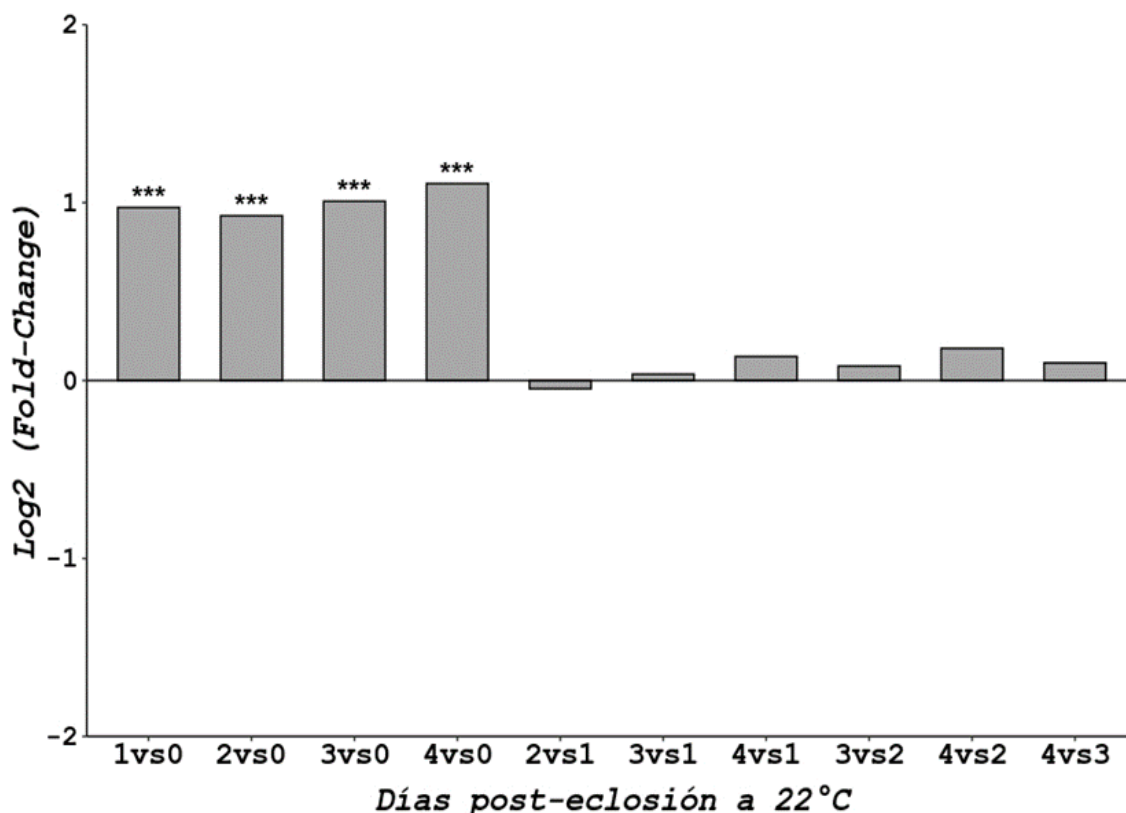
**Figura 22.** Comparación de la expresión relativa del transcrito de deiodinasa 2 (*dio2*) (Log<sub>2</sub> Fold-Change) de los días uno y día dos a tres diferentes temperatura de incubación de 22°C, 26°C y 28°C (qPCR). Las barras indican el error estándar (S.E.).

### 7.3.6 Transcrito receptor de hormona tiroidea alfa: *Thra*

Los resultados *in silico* mostraron un incremento de los conteos por millón (cpm) del transcrito *thra-B X2* desde el día cero (5.16 cpm  $\pm$  0.75 S.D.) al día uno (10.14 cpm  $\pm$  1.31 S.D.). Posteriormente se mantuvo la transcripción de forma constante en promedio de 10.37 cpm  $\pm$  0.95, a través de los días (Fig. 23). Los resultados de expresión diferencial indicaron un incremento significativo en la proporción ( $\text{Log}_2$  Fold-Change) de la expresión del transcrito *thra-B X2* cuando se compararon los días posteriores de desarrollo contra el día cero ( $FDR < 0.01$  y  $FDR < 0.001$ ). Cuando se realizaron las otras comparaciones entre los días siguientes a la eclosión, se observó que no existieron diferencias significativas ( $FDR > 0.05$ ), (Fig. 24).



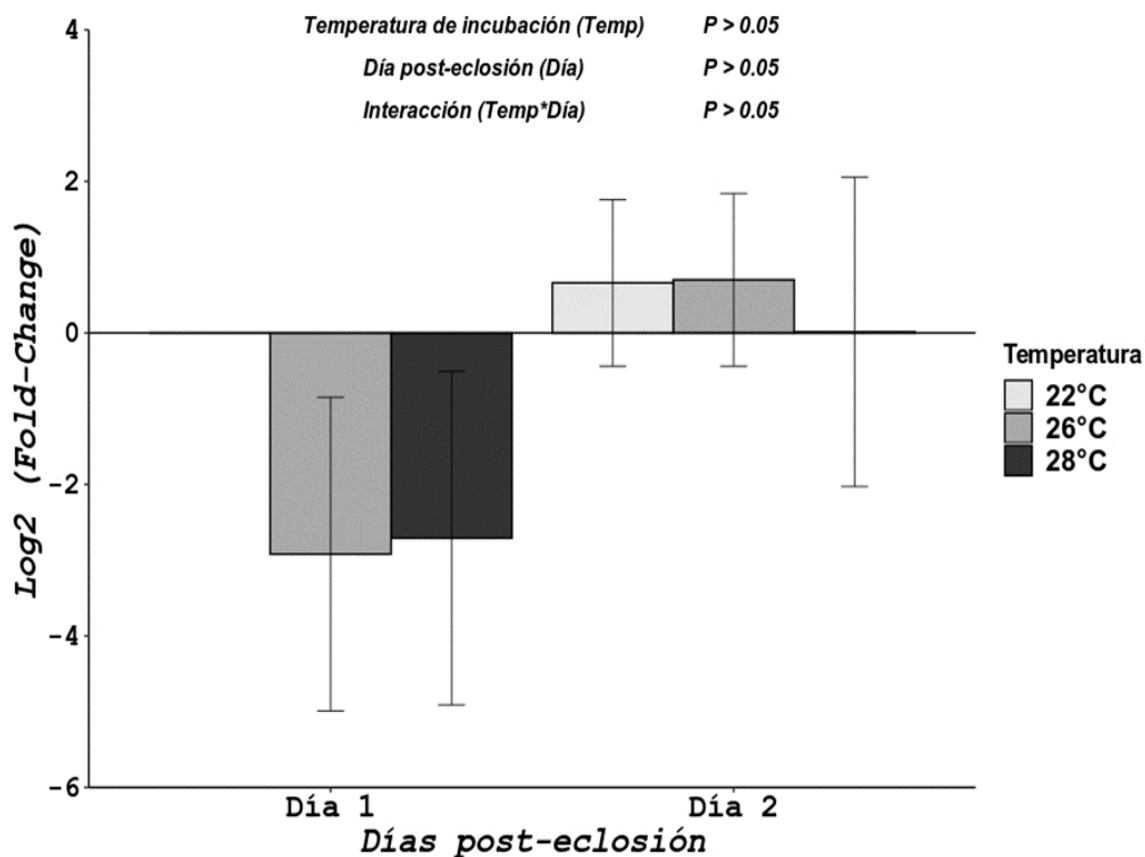
**Figura 23.** Cuantificación del transcrito receptor de hormona tiroidea alfa B variante X2 (*trha-B X2*), durante los primeros 5 días de desarrollo a una temperatura de incubación de 22°C (CPM: conteos por millón). Las barras indican la desviación estándar (S.D.).



**Figura 24.** Expresión diferencial in silico del transcrito receptor de hormona tiroidea alpha B variante X2 (*thra-B X2*), comparación entre los primeros cinco días de desarrollo larvario a una temperatura de incubación de 22°C. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre los días evaluados. \*  $FDR < 0.05$ , \*\*  $FDR < 0.01$ , \*\*\*  $FDR < 0.001$ .

En los resultados de qPCR que se analizaron mediante una ANOVA de dos vías, se observó que no existió un efecto de la temperatura de incubación de las larvas sobre la expresión del gen *thra-B X2* (22 °C: 0.66 Log<sub>2</sub> Fold-Change ± 1.1 S.E., 26 °C: -1.11 Log<sub>2</sub> Fold-Change ± 1.29 S.E. y 28 °C: -1.35 Log<sub>2</sub> Fold-Change ± 1.48 S.E.), ( $P > 0.05$ ). Adicionalmente, no presentaron diferencias significativas en la expresión del gen *thra-B X2* entre el día uno (-2.82 ± 1.4 S.E.) y el día dos (0.46 Log<sub>2</sub> Fold-Change ± 0.78 S.E.), ( $P > 0.05$ ), ni tampoco una interacción significativa

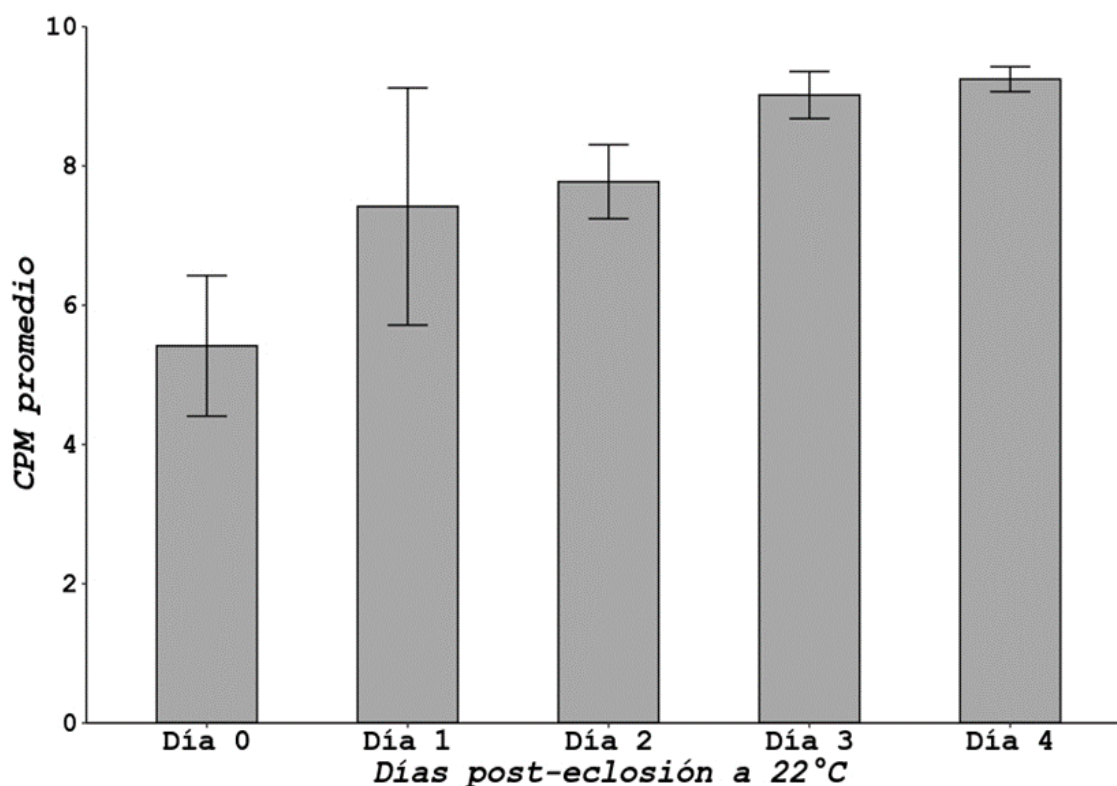
entre la temperatura de incubación y los días de desarrollo larvario ( $P > 0.05$ ), (Fig. 25).



**Figura 25.** Comparación de la expresión relativa del transcrito receptor de hormona tiroidea alpha B variante X2 (thra-B X2) (Log<sub>2</sub> Fold-Change) de los días uno y día dos a tres diferentes temperatura de incubación de 22°C, 26°C y 28°C (qPCR). Las barras indican el error estándar (S.E.).

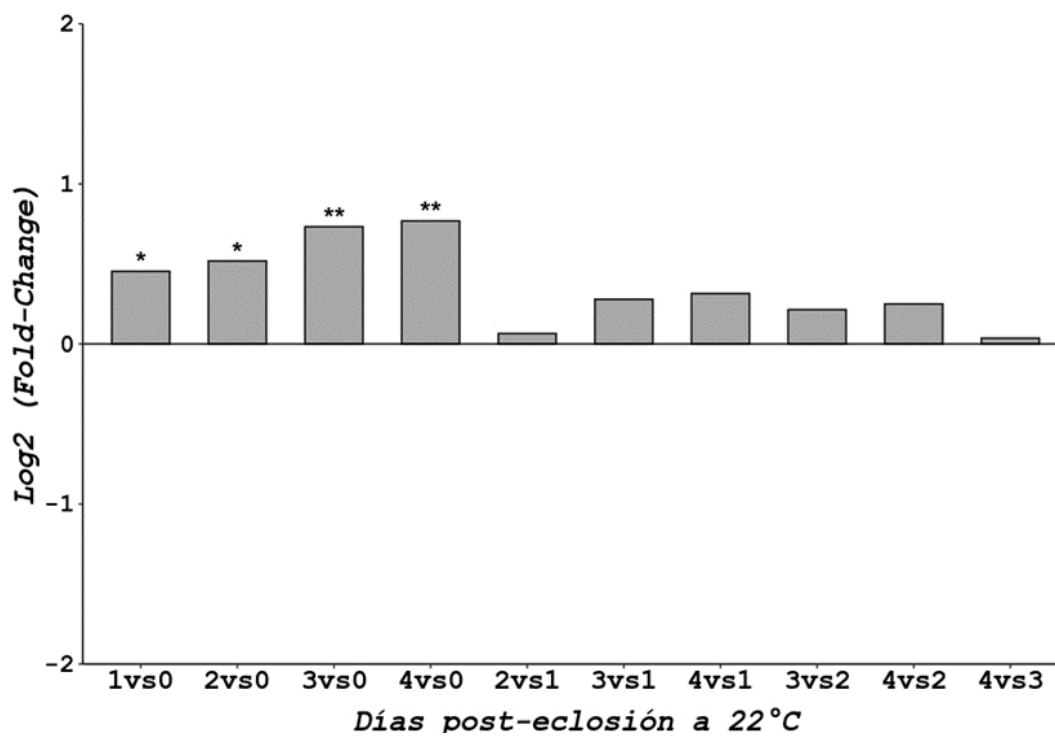
### 7.3.7 Transcrito receptor de hormona tiroidea beta: *Thrb*

Los resultados *in silico* mostraron un incremento de los conteos por millón (cpm) del transcrito *thrb X1* desde el día cero (5.41 cpm  $\pm$  1.0 S.D.) al día uno (7.41 cpm  $\pm$  1.7 S.D.). Posteriormente se mantuvo la transcripción en un promedio de 8.36 cpm  $\pm$  0.68 S.D., a través de los siguientes días de desarrollo larvario (Fig. 26). En los resultados de expresión diferencial se pudo observar que existió un incremento significativo en la proporción ( $\text{Log}_2$  Fold-Change) de la expresión del transcrito *thrb X1* cuando se compararon los días posteriores de desarrollo contra el día cero ( $FDR < 0.05$  y  $FDR < 0.01$ ). Sin embargo, cuando se compararon los días siguientes a la eclosión no existieron diferencias significativas entre ellos ( $FDR > 0.05$ ), (Fig. 27).



**Figura 26.** Cuantificación del transcrito receptor beta de la hormona tiroidea variante X1 (*thb X1*), durante los primeros 5 días de desarrollo a una temperatura

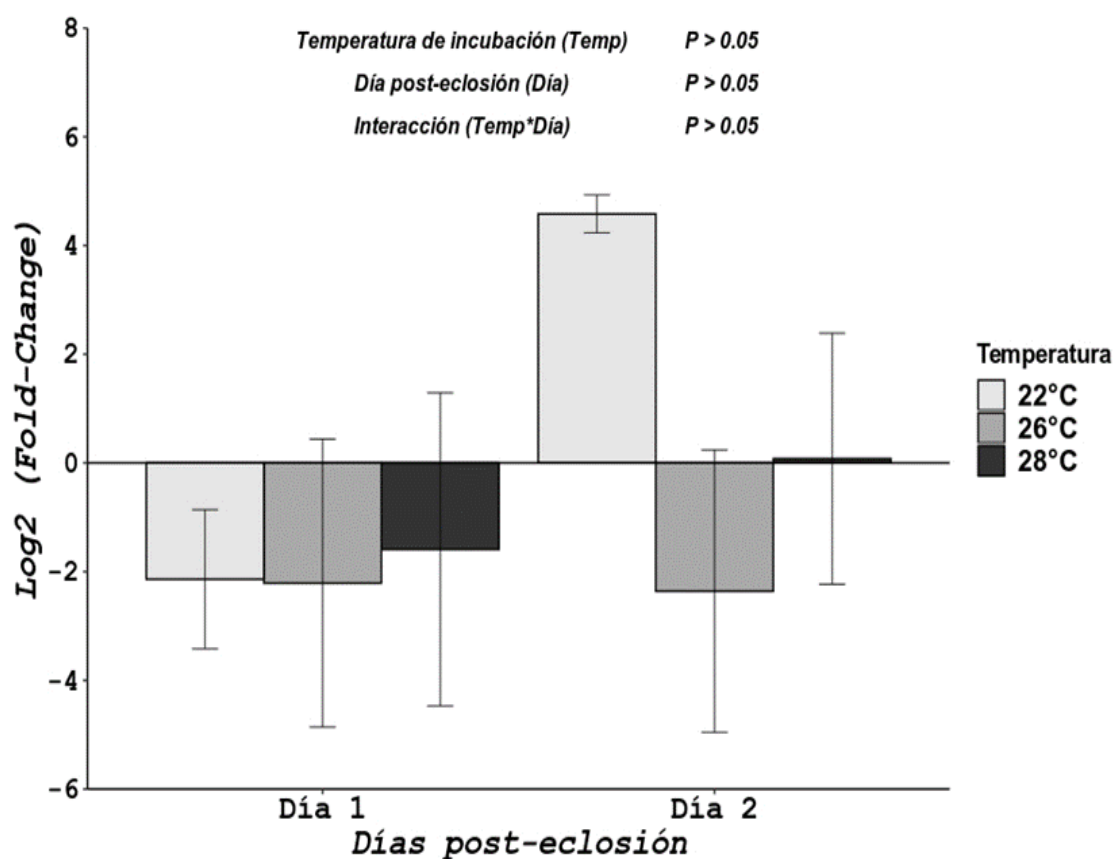
de incubación de 22°C (CPM: conteos por millón). Las barras indican la desviación estándar (S.D.).



**Figura 27.** Expresión diferencial *in silico* del transcrito receptor beta de la hormona tiroidea variante X1 (*thrb X1*), comparación entre los primeros cinco días de desarrollo larvario a una temperatura de incubación de 22°C. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre los días evaluados. \*  $FDR < 0.05$ , \*\*  $FDR < 0.01$ , \*\*\*  $FDR < 0.001$ .

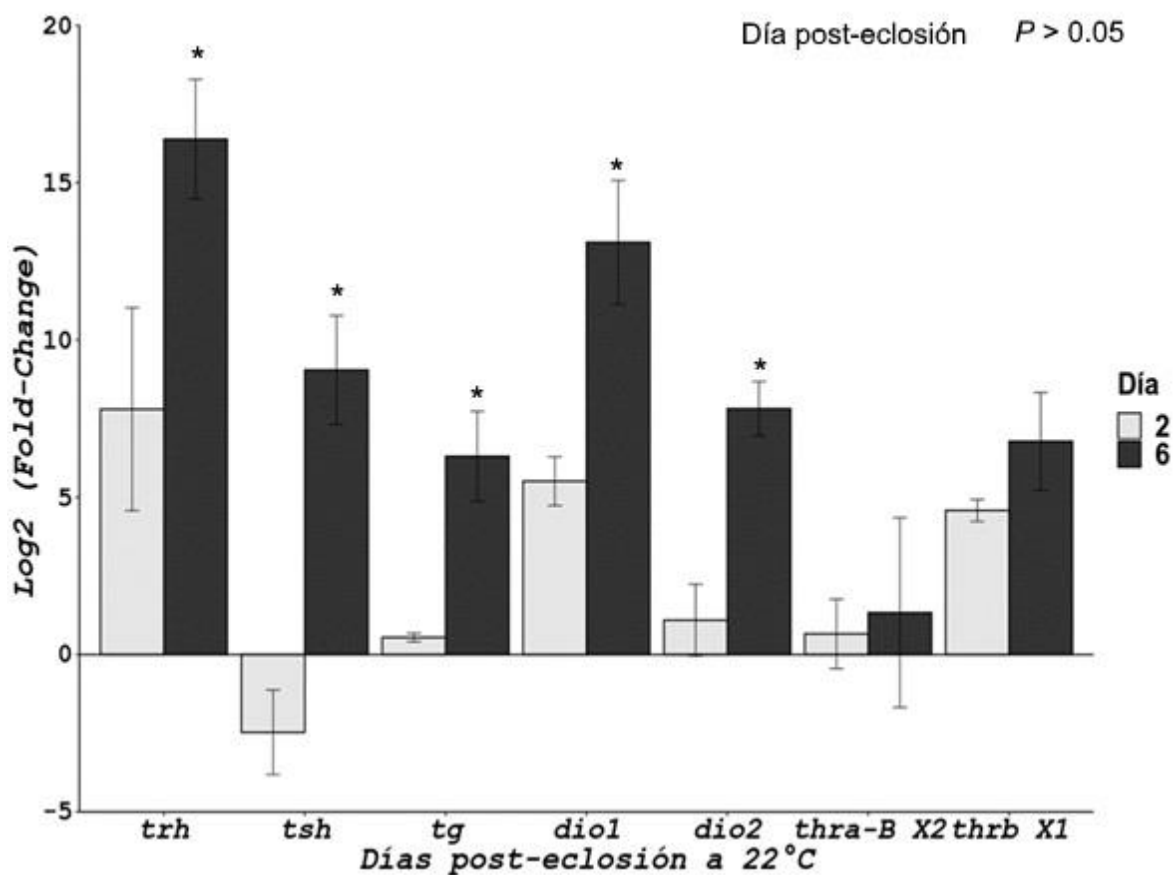
En los resultados de qPCR para la temperatura de 22 °C, cuando se analizaron de forma independiente, se observó un incremento significativo de la expresión del gen *thrb X1* en el día dos respecto al día uno ( $P < 0.01$ ); este resultado fue diferente del obtenido *in silico*, en donde no se obtuvieron diferencias significativas entre los días dos y uno de desarrollo larvario a 22°C ( $FDR > 0.05$ ). Cuando los resultados de qPCR se analizaron mediante una ANOVA de dos vías, se observó que no existió un efecto de la temperatura de incubación de las larvas sobre la expresión del gen *thrb X1* (22 °C: 1.22 Log<sub>2</sub> Fold-Change ± 1.41 S.E., 26 °C: -2.29

Log<sub>2</sub> Fold-Change  $\pm$  1.72 S.E. y 28 °C: -0.64 Log<sub>2</sub> Fold-Change  $\pm$  1.68 S.E.), ( $P > 0.05$ ). Adicionalmente, no se presentaron diferencias significativas en la expresión del gen *thrb X1* entre el día uno (-2.02 Log<sub>2</sub> Fold-Change  $\pm$  1.18 S.E.) y el día dos (0.76 Log<sub>2</sub> Fold-Change  $\pm$  1.36 S.E.), ( $P > 0.05$ ), ni tampoco una interacción significativa entre la temperatura de incubación y los días de desarrollo larvario ( $P > 0.05$ ) (Fig. 28).



**Figura 28.** Comparación de la expresión relativa del transcrito receptor beta de la hormona tiroidea variante X1 (*thb X1*) (Log<sub>2</sub> Fold-Change) de los días uno y día dos a tres diferentes temperatura de incubación de 22°C, 26°C y 28°C (qPCR). Las barras indican el error estándar (S.E.)

A continuación, se presenta la expresión diferencial de todos los genes evaluados del eje tiroideo, comparando el día dos con el día seis a 22°C, en donde se observó un incremento significativo en cada uno de ellos conforme las larvas se desarrollan, con la excepción de los receptores nucleares (Fig. 29).



**Figura 29.** Comparación de todos los genes evaluados del eje tiroideo entre el día dos y el día seis a 22°C, mostrando una expresión diferencial significativa en cada uno de ellos, con la excepción de los receptores nucleares.



## **8. DISCUSION**

### **8.1 Tasas de eclosión a diferentes temperaturas**

El éxito en el cultivo de peces marinos es la producción masiva de juveniles, proceso que depende en gran medida de la primera alimentación exogena y del desarrollo y crecimiento normal de las larvas de peces (Tanaka *et al.*, 1995).

Los porcentajes en las tasas de eclosión de 85, 85 y 80%, a 22, 26 y 28 °C, respectivamente, se encontraron en un valor cercano al 80% como el previamente reportado para *Seriola rivoliana* (Roo *et al.*, 2014). Sin embargo, otros tres desoves que se incubaron con anterioridad, presentaron tasas de eclosión entre un 30 y 50%, por lo que se tuvieron que descartar. Aunque los huevos presentan una alta fertilización por arriba del 98%, esta condición no garantiza un buen desarrollo embrionario y altas tasas de eclosión. Actualmente no existe un “marcador” ya sea molecular, bioquímico o morfológico que pueda predecir la calidad de un desove. En este sentido, la evaluación de los genes del eje tiroideo en cuanto a la calidad de los desoves requerirá de subsecuentes investigaciones.

### **8.2 Hormonas tiroideas en huevos y larvas de peces**

Los primeros estudios se enfocaron en la medición las hormonas tiroideas (TH) principalmente en el torrente sanguíneo en juveniles y adultos, lo cual llevó a la comprensión de su papel fisiológico. En huevos y larvas de peces se sabe que las TH tienen funciones reguladoras en la diferenciación, principalmente en la reorganización de los tejidos durante la embriogénesis, también interviene en la maduración de los embriones mediante la promoción del crecimiento y el

desarrollo (Brown *et al.*, 2014) y finalmente están directamente involucradas en la metamorfosis larvaria (Power *et al.*, 2001, Yamano, 2005).

### **8.3 Hormona liberadora *trh* y estimulante *tsh* de tiroides**

La expresión *in silico* de *trh* en el hipotálamo se observó estable, y no fue afectada por la temperatura, más sí por la edad de la larva en tiempo real. Lo anterior sugiere que *trh* es abundante desde que es depositada por el plasma materno, y subsecuentemente comienza un incremento en su expresión, lo cual asegura el estado fisiológico de la larva, ya que los núcleos hipotalámicos median mecanismos autónomos, actividad endocrina y funciones somáticas como la temperatura corporal, apetito y secreción interna de hormonas endocrinas a través de la estimulación directa con la pituitaria, como el factor liberador de la hormona tiroidea, el factor liberador de corticotropina, el factor liberador de hormona de crecimiento y el factor liberador de gonadotropinas, entre otros (Pittman *et al.*, 2013). Por otro lado, la expresión relativa de *tsh* en la pituitaria fue muy elevada en el momento de la eclosión, disminuyendo a partir del día uno, lo que evidenció una expresión diferencial negativa con respecto a la eclosión *in silico*, lo cual también sugiere que *tsh* es suministrada en gran cantidad mediante el plasma materno, asegurando la funcionalidad de la pituitaria de enviar diversas señales endocrinas para cumplir diferentes funciones, entre ellas, la estimulación de los folículos tiroideos, por lo que de la misma manera que *trh*, su expresión se incrementa con respecto a la edad de la larva. Cabe señalar que la pituitaria es el principal regulador de otras glándulas endocrinas, como la tiroides, las glándulas interrenales (en la regulación de cortisol) y las gónadas (esteroides sexuales) (Pittman *et al.*, 2013). En larvas de halibut o lenguado del Atlántico *Hippoglossus hippoglossus* la pituitaria se encuentra completamente desarrollada durante la absorción del saco vitelino (Einarsdóttir *et al.*, 2006). La edad en que se diferencia la glándula pituitaria varía entre las especies, pero generalmente coincide con el

momento de la pigmentación ocular en la mayoría de las larvas de peces marinos, cuando termina la absorción del saco vitelino (Tanaka *et al.*, 1995).

#### **8.4 Las hormonas tiroideas en relación con la metamorfosis en los peces**

La metamorfosis es un proceso de cambio de una forma larval a una adulta, la cual influye en la morfología, fisiología, bioquímica, comportamiento y ecología en vertebrados. La metamorfosis está bajo la influencia de las hormonas tiroideas en donde se produce un aumento de tiroxina (T4) o triyodotironina (T3) en los folículos tiroideos. Las larvas están sujetas a cambios en la cascada de señalización de hormonas tiroideas, partiendo de la expresión y transformación de la proteína tiroglobulina a T4 y T3, en donde diferentes factores abióticos como el fotoperiodo, la calidad del agua, la dieta, la temperatura, entre otros influyen de manera directa (Pittman *et al.*, 2013). La metamorfosis puede ser incompleta o anormal, o bien, se puede presentar una pigmentación aberrante, falta de migración ocular en lenguados u otras anomalías esqueléticas, que comúnmente se observan en el cultivo larvario de peces marinos (Power *et al.*, 2008). Con lo anterior, los resultados del presente estudio indicaron una expresión mínima de tiroglobulina, en donde tanto la temperatura, la edad de la larva y su interacción fueron significativas, lo cual sugiere, aunque de forma preliminar, que la tiroglobulina (*tg*), la cual depende de la cascada del eje hipotálamo (*trh*) y pituitaria (*tsh*) se afectó por estas variables y posiblemente está asociado a la condición fisiológica de la larva, por lo que podría estar relacionada con la supervivencia en los primeros días de desarrollo larvario. Posiblemente, las afectaciones en la cascada de señalización podrían explicar la gran variación que existe entre los desoves. Adicionalmente, cabe mencionar que a temperaturas altas de 26 y 28 °C, al día dos después de la eclosión, la larva entra a la etapa inicial de alimentación exógena, con un saco vitelino prácticamente absorbido, la boca abierta, los ojos

pigmentados y el intestino distendido y dividido en su parte anterior y posterior, mientras que a 22 °C, las larvas están absorbiendo el saco vitelino y la boca está abierta, mientras que todos los demás órganos están en proceso de diferenciación, por ejemplo, la pigmentación completa de los ojos, etapa importante ya que los folículos tiroideos aparecen por primera vez en esta fase de desarrollo (Tanaka *et al.*, 1995). En este sentido, la ventana de tiempo de funcionalidad del eje tiroideo a altas temperaturas se podría ver comprometido con respecto a la velocidad de la metamorfosis.

### **8.5 Producción de hormonas tiroideas en larvas de peces**

Se sabe que en peces que eclosionan de huevos, la glándula tiroidea aún no está diferenciada al momento de la eclosión, solo unos pocos folículos aparecen en las primeras etapas del desarrollo aumentando de forma paulatina; una cantidad pequeña de folículos son capaces de producir hormonas tiroideas (Yamano, 2005). Los depósitos maternos de hormonas tiroideas disminuyen durante la embriogénesis, mientras que eje tiroideo se vuelve rápidamente funcional a partir de la eclosión y durante la absorción del saco vitelino (Tanaka *et al.*, 1995). En la dorada *Sparus aurata* ocurre alrededor del momento de la primera alimentación exógena (Szisch *et al.*, 2005), mientras que en el halibut del Atlántico ocurre antes de la absorción total del saco vitelino (Einarsdóttir *et al.*, 2006). Las hormonas tiroideas T3 y T4 aparecen al día uno después de la eclosión en la lubina rayada *Sparus sarba*, al igual que las proteínas de cortisol y de choque térmico (Deane y Woo, 2003).

Las hormonas tiroideas actúan en sinergia con los glucocorticoides (cortisol), prolactina y hormona del crecimiento para transformar las larvas en juveniles (Szisch *et al.*, 2005; Tanaka *et al.*, 1995), actuando conjuntamente en diversos procesos de desarrollo, así como una mayor supervivencia y el crecimiento (Brown y Kim 1995; De Jesús *et al.*, 1990; Lam, 1994).

## 8.6 Receptores nucleares y deiodinasas

En los tejidos periféricos que experimentan una metamorfosis, se sugiere que los corticosteroides regulan el aumento de los receptores de la hormona tiroidea y las deiodinasas que transforman las hormonas tiroideas (Brown *et al.*, 2014; Pittman *et al.*, 2013). En la anguila japónica, se observó un efecto por temperatura y edad en la expresión de los receptores y deiodinasas durante los primeros días como larva (Politis *et al.*, 2017). Los resultados del presente estudio indicaron que tanto las deiodinasas, así como los receptores, incrementan después de la eclosión (*in silico*). Sin embargo, su expresión no estuvo asociada ni a la temperatura o la edad de la larva. Lo anterior sugiere que estos genes se deben de expresar desde la embriogénesis, incrementan en la eclosión y mantienen estable su expresión sin cambios conforme la larva se desarrolla antes de la alimentación exógena (Power *et al.*, 2001). Sin embargo, la comparación de todos los genes evaluados del eje tiroideo entre el día dos y el día seis a 22 °C, mostró una expresión diferencial significativa en cada uno de ellos, con la excepción de los receptores nucleares, evidenciando que al menos a 22 °C, las deiodinasas incrementan su expresión conforme la edad de la larva. Dado que el cortisol puede influenciar la expresión de estos genes, futuros ensayos tendrán que analizar si la concentración de cortisol está correlacionada con la expresión de receptores y deiodinasas.

Para *S. rivoliana* se lograron identificar cinco variantes de los receptores nucleares tiroideos en los primeros días de desarrollo post-eclosión, tres transcritos que anotaron para el receptor tiroideo alpha (*thra*, *thra-B X1* y *thra-B X2*) y dos transcritos que anotaron para el receptor tiroideo beta (*thrb X1* y *thrb X2*). Desde el

primer día post-eclosión tanto el receptor alfa como beta mantienen de forma activa su transcripción. Estos dos receptores se transcriben en cantidad de forma similar durante los primeros días desarrollo. Estos mismos transcritos también fueron detectados *in vivo* durante los dos primeros días post-eclosión.

Nuestros resultados coinciden con lo reportado para el pez zebra, en donde se encontraron varias isoformas. En esta especie se determinó que los transcritos de los receptores tiroideos se encuentran en los huevos sin fertilizar, y a unas pocas horas de la fertilización inicia la transcripción de estos (Liu and Chan, 2002; Walpita *et al.*, 2007). Se ha reportado que el receptor nuclear *thraA1* se expresa a pocas horas post-fertilización (Essner *et al.*, 1997). También los receptores beta se han detectado a las 33 y 48 horas post-fertilización en larvas de *Sparus aurata* (Nowell *et al.*, 2001). Ambos estudios coinciden con nuestras observaciones para *S. rivoliana* para los transcritos *thra-B X2* y *thrb X1*, los cuales se pudieron detectar en las primeras horas post-eclosión.

### **8.7 Comparación de la expresión entre el día dos y seis**

La comparación de todos los genes evaluados del eje tiroideo entre el día dos y el día seis a 22°C, mostró una expresión diferencial significativa en cada uno de ellos, con la excepción de los receptores nucleares, lo cual confirma que el eje hipotálamo-pituitaria-tiroides se activa a partir del día uno después de la eclosión y gradualmente se hace totalmente funcional. Dicha etapa pudiera estar asociada a la supervivencia de las larvas en su desarrollo temprano.

## 9. CONCLUSIONES

1. Los genes evaluados *in silico* en este estudio presentaron una expresión diferencial a partir del día uno, con la excepción de la hormona liberadora de tirotropinas (TRH-hipotálamo).
2. La expresión del gen por qPCR de la hormona liberadora de tirotropina (TRH-hipotálamo) estuvo influenciada por la edad de la larva, más no por la temperatura.
3. La expresión del gen por qPCR de la hormona estimulante de la tiroides (TSH-pituitaria), estuvo influenciada por la temperatura de 26°C y 28 °C, más no por la edad de la larva.
4. La tiroglobulina (Tg) fue el único gen que estuvo influenciado por la temperatura, la edad de la larva y su interacción, lo que sugiere que esta proteína, al ser el producto final de la cascada de señalización, podría estar relacionada con la supervivencia de la larva, por lo que se requiere de más investigación.
5. La expresión de genes para las deiodinasas (Dio1 y Dio2) y los receptores nucleares ( $thr\alpha$  y  $thr\beta$ ) no tuvieron diferencias significativas en función a la temperatura, pero si por la edad de la larva (*in silico*), lo que sugiere que estos genes se encuentran expresados desde la embriogénesis.

## 10. LITERATURA CITADA

Alvarez-Lajonchère, L., L. Ibarra-Castro, N. García-Aguilar. 2011. Reproducción controlada. En: Alvarez-Lajonchère, L. S., A. C. Puello Cruz. (eds.). El pargo flamenco: *Lutjanus guttatus*, producción controlada de huevos, larvas y juveniles. Mazatlán, México, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo y AM Ediciones, Primera edición. México, D. F. pp 1-169.

Aranda, P. S., D. M. LaJoie, C. L. Jorcyk. 2012. Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis*. 33:366-369.

Avilés-Quevedo, A., F. Castelló-Orvay. 2004. Manual para el cultivo de *Seriola lalandi* (Pisces: Carangidae) en Baja California Sur, México. Instituto Nacional de Pesca. SAGARPA. México, D. F. 64 p.

Bianco, A. C., R. R. da Conceição. 2018. The Deiodinase trio and thyroid hormone signaling. *Methods Mol. Biol.* 1801:67-83.

Blanton, M. L., J. L. Specker. 2007. The hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis in fish and its role in fish development and reproduction. *Crit. Rev. Toxicol.* 37:97-115.

Blaxter, J.H.S., G. Hempel. 1963. The influence of egg size on herring larvae (*Clupea harengus* L.). *J. Cons. Int. Explor. Mer.* 28:211-240.

Blaxter, J. H. S. 1969. Development: eggs and larvae. En: Hoar, W., D. J. Randall (eds.). *Fish Physiology*. Vol. III. Academic Press, New York. pp. 177-252.  
Blaxter, J.H.S. 1992. The effect of temperature on larval fishes. *Neth. J. Zool.* 42:336-357.

Bloise, F. F., A. Cordeiro, T. M. Ortiga-Carvalho. 2018. Role of thyroid hormone in skeletal muscle physiology. *J. Endocrinol.* 236:R57-R68.

Boron, W. F., E. L. Boulpaep. 2003. *Medical Physiology: A cellular and molecular approach*. Elsevier/Saunders. Primera Edición. Philadelphia, PA. 1319 pp.



- Bowyer, J. N., M. A. Booth, J. G. Qin, T. D'Antignana, M. J. S. Thompson, D. A. J. Stone. 2013. Temperature and dissolved oxygen influence growth and digestive enzyme activities of yellowtail king fish *Seriola lalandi* (Valenciennes 1833). *Aqua. Res.* 45:210-220.
- Brown, C. L., C. V. Sullivan, H. A. Bern, W. W. Dickhoff. 1987. Occurrence of thyroid hormones in early developmental stages of teleost fish. *Am. Fish. Soc. Symp.* 2:144-150.
- Brown, C. L., S. I. Doroshov, M. D. Cochran, H. A. Bern. 1989. Enhanced survival in striped bass fingerlings after maternal triiodothyronine treatment. *Fish Physiol. Biochem.* 7:295-299.
- Brown, C. L., B. G. Kim. 1995. Combined application of cortisol and triiodothyronine in the culture of larval marine finfish. *Aquaculture.* 135:79-86.
- Brown, C. L., E. C. Urbinatti, W. Zhang, S. B. Brown, M. McComb-Kobza. 2014. Maternal thyroid and glucocorticoid hormone interaction in larval fish development and their application in aquaculture. *Fisher. Sci. Aquacult.* 22:207-220.
- Buckley, L. J. 1984. RNA-DNA ratio: an index of larval fish growth in the sea. *Mar. Biol.* 80:291-298.
- Bussing, W. A., M. I. López. 2005. Fishes of Cocos Island and reef fishes of the Pacific coast of lower Central America. Editorial Universidad de Costa Rica. 53 p.
- Campinho, M. A., M. Galay-Burgos, G. E. Sweeney, D. M. Power. 2010. Coordination of deiodinase and thyroid hormone receptor expression during the larval to juvenile transition in sea bream (*Sparus aurata*, Linnaeus). *Gen. Comp. Endocr.* 165:181-194.
- Carvalho, D. P., C. Dupuy. 2017. Thyroid hormone biosynthesis and release. *Mol. Cell. Endocrinol.* 458:6-15.
- Castañeda Cortés, D. C., V. S. Langlois, J. I. Fernandino. 2014. Crossover of the hypothalamic pituitary–adrenal/interrenal–thyroid, and–gonadal axes in testicular development. *Front. Endocrinol.* 5:139.
- Chapman, L., A. Desurmont, P. Boblin, W. Sokimi, S. Beverly. 2008. Fish species identification manual for deep-bottom snapper fishermen: Manuel d'identification des poissons destiné aux pêcheurs de vivaneaux profonds. SPC FAME Digital Library.

- Chopra, I. J. 1976. An assessment of daily production and significance of thyroidal secretion of 3, 3', 5'-triiodothyronine (reverse T3) in man. *J. Clin. Invest.* 58(1):32-40.
- Comeau, L. A., S. E. Campana, J. M. Hanson, G. A. Chouinard. 2000. Seasonal changes of thyroid hormones in field-collected Atlantic cod in relation to condition indices, water temperature and photoperiod. *J. Fish Biol.* 57:571-588.
- Deane, E. E., N. Y. Woo. 2003. Ontogeny of thyroid hormones, cortisol, hsp70 and hsp90 during silver sea bream larval development. *Life Sci.* 72:805-818.
- De Jesus, E. G., Y. Inui, T. Hirano. 1990. Cortisol enhances the stimulating action of thyroid hormones on dorsal fin-ray resorption of flounder larvae in vitro. *Gen. Comp. Endocr.* 79:167-173.
- Despatie, S. P., M. Castonguay, D. Chabot, C. Audet. 2001. Final thermal preferendum of Atlantic cod: effect of food ration. *T. Am. Fish. Soc.* 130:263-275.
- Eales, J. G., S. B. Brown. 1993. Measurement and regulation of thyroidal status in teleost fish. *Rev. Fish Biol. Fisher.* 3(4):299-347.
- Eales, J. G., S. B. Brown, D. G. Cyr, B. A. Adams, K. R. Finnon. 1999. Deiodination as an index of chemical disruption of thyroid hormone homeostasis and thyroidal status in fish. En: Henshel, D.S., M. Harrass, M. Black (eds.). *Environmental toxicology and risk assessment: standardization of biomarkers for endocrine disruption and environmental assessment.* ASTM International. Primera edición. West Conshohocken. pp 136-164.
- Einarsdóttir, I. E., N. Silva, D. M. Power, H. Smaradottir, B. T. Björnsson. 2006. Thyroid and pituitary gland development from hatching through metamorphosis of a teleost flatfish, the Atlantic halibut. *Anat. Embryol.* 211:47-60.
- Essner, J. J., J. J. Breuer, R. D. Essner, S. C. Fahrenkrug, P. B. Hackett. 1997. The zebrafish thyroid hormone receptor  $\alpha 1$  is expressed during early embryogenesis and can function in transcriptional repression. *Differentiation.* 62:107-117.
- FAO. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma, Italia. 224 p.
- Fernandes, I., N. Nogueira, G. Faria, T. Fernandes, M. Faria, N. Cordeiro. 2018. Lipid and fatty acid composition of wild almaco jack *Seriola rivoliana* at two maturation stages. *Turk. J. Fish Aquat. Sc.* 18:959-967.

Ferron, A., W. C. Leggett. 1994. An appraisal of condition measures for marine fish larvae. En: Blaxter, J. H. S., A. J. Southward (eds). *Advances in Marine Biology* Vol. 30. Academic Press. pp 217-303.

Fisher, W., F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K. E. Carpenter, V. H. Niem. 1995. Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca: Pacífico Centro-Oriental. Vol. II. Vertebrados-Parte 1. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia. pp. 647-1200.

Gasparini, J. L. y S. R. Floeter, 2001. The shore fishes of Trindade island western south Atlantic. *J. Nat. Hist.* 35:1639-1656.

Gavrila, A., A. N. Hollenberg. 2019. The hypothalamic-pituitary-thyroid axis: Physiological Regulation and Clinical Implications. En: Luster, M., L. Duntas, L. Wartofsky (eds). *The thyroid and its diseases*. Springer, Cham. pp 13-23.

Govoni, J. J., G. W. Boehlert, Y. Watanabe. 1986. The physiology of digestion in fish larvae. *Environ. Biol. Fish.* 16:59-77.

Hadley, M. E., 1992. Principles of endocrinology. En: Jameson, J. L. (ed). *Endocrinology*, 3rd ed. Prentice-Hall International, London, U. K. pp 1-15.

Hamre, K., C. Krossøy, E. J. Lock, M. Moren. 2010. Roles of lipid-soluble vitamins during ontogeny of marine fish larvae. *Aquac. Res.* 41:745-750.

Heming, T. A., R. K. Buddington. 1988. Yolk absorption in embryonic and larval fishes. *Fish Physiol.* 11A:407-446.

Inui, Y., S. Miwa. 1985. Thyroid hormone induces metamorphosis of flounder larvae. *Gen. Comp. Endocr.* 60:450-454.

Inui, Y., M. Tagawa, S. Miwa, T. Hirano. 1989. Effects of bovine TSH on the tissue thyroxine level and metamorphosis in prometamorphic flounder larvae. *Gen. Comp. Endocr.* 74:406-410.

Johnston, C. E., J. G. Eales. 1995. Effects of acclimation and assay temperature on outer-and inner-ring thyroxine and 3, 5, 3'-triiodo-L-thyronine deiodination by liver microsomes of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Zool.* 276:426-434.

Kamler, E. 1992. Early life history of fish: an energetics approach. Springer Science. 215 pp.

- Kawakami, Y., K. Nomura, H. Ohta, H. Tanaka. 2013. Characterization of thyroid hormone receptors during early development of the Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Gen. Comp. Endocr.* 194:300-310.
- Kinne, O., E. M. Kinne. 1962. Rates of development in embryos of a cyprinodont fish exposed to different temperature–salinity–oxygen combinations. *Can. J. Zool.* 40:231-253.
- Kjørsvik, E., K. Pittman, D. Pavlov. 2004. From fertilisation to the end of metamorphosis—functional development. En: Kjørsvik, E., Y. O. Trondhjem (eds.). *Culture of cold-water marine fish*. Blackwell Publishing, pp 204-278.
- Klaren, P. H., Y. S. Wunderink, M. Yufera, J. M. Mancera, G. Flik. 2008. The thyroid gland and thyroid hormones in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) during early development and metamorphosis. *Gen. Comp. Endocr.* 155:686-694.
- Köhrle, J. 2005. Selenium and the control of thyroid hormone metabolism. *Thyroid.* 15:841-853.
- Kohrle, J., F. Jakob, B. Contempre, J. E. Dumont. 2005. Selenium, the thyroid, and the endocrine system. *Endocr. Rev.* 26:944-984.
- Lagler, K. F., J. E. Bardach, R. R. Miller, D. R. M. Passino. 1977. *Ichthyology*. John Wiley and Sons, Inc. New York, N. Y. 505 pp.
- Lam, T. J. 1980. Thyroxine enhances larval development and survival in *Sarotherodon (Tilapia) mossambicus* Ruppell. *Aquaculture.* 21:287-291.
- Lam, T. J. y R. Sharma. 1985. Effects of salinity and thyroxin on larval survival, growth and development in the carp *Cyprinus carpio*. *Aquaculture.* 44:201-212.
- Lam, T. J. 1994. Hormones and egg/larval quality in fish. *J. World Aquacult. Soc.* 25:2-12.
- Lazcano, I., A. Orozco. 2018. Revisiting available knowledge on teleostean thyroid hormone receptors. *Gen. Comp. Endocr.* 265:128-132.
- Liu, Y. W., W. K. Chan. 2002. Thyroid hormones are important for embryonic to larval transitory phase in zebrafish. *Differentiation.* 70:36-45.
- Mangelsdorf, D. J., C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schütz, K. Umesono, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon, R. M. Evans. 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell.* 83:835.

Matthews, K. S., J. C. Nichols. 1997. Lactose repressor protein: functional properties and structure. En: Moldave, K. (ed). Progress in nucleic acid research and molecular biology, Vol 59. pp 1-373.

Masumoto, T. 2002. Yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. En: Webster, C. D., C. Lim (eds.). Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture. Cabi. pp. 131-146.

Mullur, R., Y. Y. Liu, G. A. Brent. 2014. Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiol. Rev.* 94:355-382.

Mylonas, C. C., C. V. Sullivan, J. M. Hinshaw. 1994. Thyroid hormones in brown trout (*Salmo trutta*) reproduction and early development. *Fish Physiol. Biochem.* 13:485-493.

Nikodem, V. M., K. J. Petty, T. Mitsuhashi, B. Desvergne. 1990. En: Greer, M. A. (ed). The thyroid gland. Raven Press, New York pp 307-321.

Nowell, M. A., D. M. Power, A. V. Canario, L. Llewellyn, G. E. Sweeney. 2001. Characterization of a sea bream (*Sparus aurata*) thyroid hormone receptor- $\beta$  clone expressed during embryonic and larval development. *Gen. Comp. Endocrinol.* 123:80-89.

O'Connor, C. M. J. U. Adams. 2010. Essentials of Cell Biology. Cambridge, MA: NPG Education.

Ojanguren, A. F., F. Brana. 2003. Thermal dependence of embryonic growth and development in brown trout. *J. Fish Biol.* 62:580-590.

Oppenheimer, J. H., H. L. Schwartz, C. N. Mariash, W. B. Kinlaw, N. C. W. Wong, H. C. Freake. 1987. Advances in our understanding of thyroid hormone action at the cellular level. *Endocr. Rev.* 8:288-308.

Orozco, A., C. Valverde-R. 2005. Thyroid hormone deiodination in fish. *Thyroid.* 15:799-813.

Ortiz-Delgado, J. B., N. M. Ruane, P. Pousão-Ferreira, M. T. Dinis, C. Sarasquete. 2006. Thyroid gland development in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858) during early life stages: a histochemical and immunohistochemical approach. *Aquaculture.* 260:346-356.

Özeren, S. C., G. B. Kankılıç, B. Erkmen, H. Polat, E. Pehlivan. 2019. Effect of seasonal water temperature variation on the blood serums thyroid hormone levels of juvenile chub fishes (*Squalius cappadocicus*). *Biol. Rhythm. Res.* 1-6.

Pankhurst, N. W. 2011. The endocrinology of stress in fish: an environmental perspective. *Gen. Comp. Endocrinol.* 170:265-275.

Parker, S. J., J. L. Specker. 1990. Salinity and temperature effects on whole-animal thyroid hormone levels in larval and juvenile striped bass, *Morone saxatilis*. *Fish Physiol. Biochem.* 8:507-514.

Peter, M. S. 2011. The role of thyroid hormones in stress response of fish. *Gen. Comp. Endocr.* 172:198-210.

Pittman, K., M. Yúfera, M. Pavlidis, A. J. Geffen, W. Koven, L. Ribeiro, J. L. Zambonino-Infante, A. Tandler. 2013. Fantastically plastic: fish larvae equipped for a new world. *Rev. Aquacult.* 5:S224-S267.

Politis, S. N., A. Servili, D. Mazurais, J. L. Zambonino-Infante, J. J. Miest, J. Tomkiewicz, I. A. Butts. 2018. Temperature induced variation in gene expression of thyroid hormone receptors and deiodinases of European eel (*Anguilla anguilla*) larvae. *Gen. Comp. Endocr.* 259:54-65.

Ponce, M., I. Giraldez, S. Calero, P. Ruiz-Azcona, E. Morales, C. Fernández-Díaz, I. Hachero-Cruzado. 2018. Toxicity and biochemical transformation of selenium species in rotifer (*Brachionus plicatilis*) enrichments. *Aquaculture.* 484:105-111.

Porcher, C., M. C. Malinge, C. Picat, B. Grandchamp. 1992. A simplified method for determination of specific DNA or RNA copy number using quantitative PCR and an automatic DNA sequencer. *Biotechniques* 13:106-114.

Power, D. M., L. Llewellyn, M. Faustino, M. A. Nowell, B. T. Björnsson, I. E. Einarsdóttir, A. V. M. Canario, G. E. Sweeney. 2001. Thyroid hormones in growth and development of fish. *Comp. Biochem. Phys.* 130:447-459.

Power, D. M., I. E. Einarsdóttir, K. Pittman, G. E. Sweeney, J. Hildahl, M. A. Campinho, N. Silva, O. Sæle, M. Galay-Burgos, H. Smáradóttir, B. T. Björnsson. 2008. The molecular and endocrine basis of flatfish metamorphosis. *Rev. Fish Sci.* 16:sup1, 95-111.

Ren, X. y L. Guo. 2013. Molecular toxicology of polybrominated diphenyl ethers: nuclear hormone receptor mediated pathways. *Environ. Process Imp.* 15:2-18.

Ribeiro, A. R. A., L. Ribeiro, Ø. Sæle, M. T. Dinis, M. Moren. 2012. Iodine and selenium supplementation increased survival and changed thyroid hormone status in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae reared in a recirculation system. *Fish Physiol. Biochem.* 38:725-734.

Rohr, K. B., M. L. Concha. 2000. Expression of *nk21a* during early development of the thyroid gland in zebrafish. *Mech. Develop.* 95:267-270.

- Romo-Mendoza, D., R. Campos-Ramos, M. A. Burgos-Aceves, D. A. Guerrero-Tortolero. 2017. Simultaneous germinal vesicle migration and oil droplet coalescence predict final oocyte maturation in the leopard grouper. *N. Am. J. Aquacult.* 79:197-204.
- Rønnestad, I., W. Koven, A. Tandler, M. Harel, H. J. Fyhn. 1998. Utilisation of yolk fuels in developing eggs and larvae of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture.* 162:157-170.
- Roo, J., H. Fernández-Palacios, C. M. Hernández-Cruz, A. Mesa-Rodríguez, D. Schuchardt, M. Izquierdo. 2014. First results of spawning and larval rearing of longfin yellowtail *Seriola rivoliana* as a fast-growing candidate for European marine finfish aquaculture diversification. *Aquac. Res.* 45:689-700.
- Rottmann, R. W., J. V. Shireman, F. A. Chapman. 1991. Introduction to hormone-induced spawning of fish. Southern Regional Aquaculture Center. 421:4.
- Samarut, J., M. Plateroti. 2018. Thyroid hormone receptors: several players for one hormone and multiple functions. En: Plateroti, M., J. Samarut (eds.). *Thyroid hormone nuclear receptor*. Humana Press, New York. pp 1-8.
- Sicuro, B., U. Luzzana. 2016. The state of *Seriola* spp. other than yellowtail (*S. quinqueradiata*) farming in the world. *Rev. Fish Sci. Aquac.* 24:314-325.
- Sinha, R., P. M. Yen. 2018. Cellular action of thyroid hormone. En: Endotext [Internet]. MDText. com, Inc.
- Smith, M. M., P. C. Heemstra. 2012. *Smiths' sea fishes*. Springer Science and Business Media. 631 pp.
- Szisch, V., N. Papandroulakis, E. Fanouraki, M. Pavlidis. 2005. Ontogeny of the thyroid hormones and cortisol in the gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Gen. Comp. Endocr.* 142:186-192.
- Tagawa, M., T. Ogasawara, T. Sakamoto, T. Miura, K. Yamauchi, T. Hirano. 1994. Thyroid hormone concentrations in the gonads of wild chum salmon during maturation. *Fish Physiol. Biochem.* 13:233-240.
- Tanaka, M., J. B. Tanangonan, M. Tagawa, E. G. De Jesus, H. Nishida, M. Isaka, R. Kimura, T. Hirano. 1995. Development of the pituitary, thyroid and interrenal glands and applications of endocrinology to the improved rearing of marine fish larvae. *Aquaculture.* 135:111-126.

- Tovo-Neto, A., M. da Silva Rodrigues, H. R. Habibi, R. H. Nóbrega. 2018. Thyroid hormone actions on male reproductive system of teleost fish. *Gen. Comp. Endocr.* 265:230-236.
- Van Hardeveld, C. 1986. Effects of thyroid hormone on oxygen consumption, heat production, and energy economy. En: Hennemann, G. (ed.). *Thyroid hormone metabolism*. Marcel Dekker. 1a ed. New York. pp 579-608.
- Vázquez-Islas G., D. A. Guerrero-Tortolero, R. Garza-Torres, R. Campos-Ramos R. (En prensa). An alternative method to extract total RNA from animal tissues. *Res. J. Biotechnol.*
- Venditti, P., M. Balestrieri, S. Di Meo, T. De Leo. 1997. Effect of thyroid state on lipid peroxidation, antioxidant defenses, and susceptibility to oxidative stress in rat tissues. *J. Endocrinol.* 155:151-157.
- Visser, W. E. 2019. Disorders of thyroid hormone transporters and receptors. En: Luster, M., L. H. Duntas, L. Wartofsky (eds.). *Primera edición. The thyroid and its diseases*. Springer, Cham. pp 49-60.
- Walpita, C. N. S. Vangeyten, E. Rurangwa, V. M. Darras. 2007. The effect of 3, 5, 3'-trioyodotironine supplementation on zebra fish (*Danio rerio*), embryonic development and expression of Iodothyronine deiodinases and thyroid hormone receptor. *Gen. Comp. Endocrinol.* 152:206-214.
- Wang, L., X. Zhang, L. Wu, Q. Liu, D. Zhang, J. Yin. 2018. Expression of selenoprotein genes in muscle is crucial for the growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets supplemented with selenium yeast. *Aquaculture.* 492:82-90.
- Wang, Z., M. Gerstein, M. Snyder. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* 10:57-63.
- Watanabe, T., V. Kiron, S. Satoh. 1997. Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture.* 151:185-207.
- Yaffe, B. M., H. H. Samuels. 1984. Hormonal regulation of the growth hormone gene. Relationship of the rate of transcription to the level of nuclear thyroid hormone-receptor complexes. *J. Biol. Chem.*, 259(10):6284-6291.
- Yamano, K., S. Miwa, T. Obinata, Y. Inui. 1991. Thyroid hormone regulates developmental changes in muscle during flounder metamorphosis. *Gen. Comp. Endocr.* 81:464-472.



Yamano, K., K. Araki, K. Sekikawa, Y. Inui. 1994. Cloning of thyroid hormone receptor genes expressed in metamorphosing flounder. *Dev. Genet.* 15:378-382.

Yamano, K. 2005. The Role of Thyroid Hormone in Fish Development with Reference to Aquaculture. *JARQ* 39:161-168.

Yen, P. M., W. W. Chin. 1994. New advances in understanding the molecular mechanisms of thyroid hormone action. *Trends Endocrin. Met.* 5:65-72.

Yúfera, M., M. J. Darias. 2007. The onset of exogenous feeding in marine fish larvae. *Aquaculture*, 268: 53-63.

## 11. ANEXOS

**Anexo A-1** Secuencias obtenidas del transcriptoma de los genes del eje hipotálamo-pituitario-tiroides.

**Tabla VII.** Secuencia obtenida del transcriptoma para la hormona liberadora de tirotrinas.

Gen	Nombre	Tamaño (pb)
<i>Trh</i>	Hormona liberadora de tirotrina	210
<b>Secuencia</b>		
GCGGGTCACCAACAGCTGCGAGAGGCTGAGAGCAACTATCATCACTGCCGG CGGTGCCATCAACAGTGAAGTGGGACGAGCAGGATCTGAATACTTCCCATAC GACCAACTAACTTACCATGAAGTCGACATGTCTTCTCATCTTGGCTTCTCTCGT GCTCTGCAACTTGACCGTGTGTGGGGGACAGGGCATCCCTGCTGAGGATGA GACGGACCGAAGGACCATAGACGACATCATCCTACAGAGAGCAGAAAGTCTC CTGTTACGGTCCATTCTCAAAAAGATGCAGGATGAAGACGAGGGATTCTCCTC TCAGCCTGAATGGGTGTCAAAACGACAGCATCCCGGTAAGAGATACGGCGAG GATTTGGAGAAGCGACAGCATCCGGGGAGGAGAGAAGAAGACGAGGATGAT CAGTACTTTGATGTTCAAAAGAGACAGCACCCGGGCAAACGCGAAGATGAAA TGCACACGTTTCATGGAGCTCCAGAAAAGGCAGCACCCGGGAA		

**Tabla VIII.** Secuencia obtenida del transcriptoma para la hormona estimulante de la tiroides.

Gen	Nombre	Tamaño (pb)
Tsh	Hormona estimulante de la tiroides	3139
Secuencia		
CTACAGCATCTCCACCTTCACAACCTCACAGAACTCCTGGGGCCCTGTAAAG AAAACTGAACATCACAGTCCAGTAAAGCTCCACTGTCTCTACCAAAGGATTAT AACCTATACACCAAAAACAAACATCATAGTCTATAATAGAGA ACTTTGCTGACA TTGGTATACATATTTGTTGTGGTGGACATCAAGAGGACCATCAGATGGAGACA AAGAAGTCAGTCTGAAGGATATTTTGGAGGCGACACTGACAGCGGGCAGCTCT CCAGCATGCAGGTGATAACATGCGCGTTGTTTATGCTCGTCACTCTCCCTGTC AGCTCGGTGTCGGAGGCTGACTCTTGCCCTGCTGTCTGCGAGTGCTCTGAGT GGAGGACTCACACCATCTCCTGCTTTGACATTGATATTCTCCCCAGGTTTCCA GCAAGCACGGAGACACTGTGGCTTTTTGAGACCCGTCTGTCAGCTGTTCCAG CAGATGTCTTTGCCAACATGGTCAACATTTCAAGGATATATATGTCAGTGGAC GTGAAGCTGCAGAGGCTGGAGAGACACTCATTCTACAACCTGAGGAAAATCA CCCACATAGAGATACGTAATGCGAAGAGTCTGACCTACATCGACCCAGAAGC CTTTAAAAATCTCCCAAACCTTAAATACCTGGGGATTTTCAACACCGGCCTTAC TTTCTTCCCGACTTGAGCAACATTCCTCTAATGACATGAACTTCATATTGGA AATTGTTGATCATCCCTACATCACTGACATCCCAGCCA ACTCTTTCCGTGGCA TCACCAGTGATGTGCTGACAGTGATGCTGTATGGAAATGGTTTCAGAGAAATC CAACATCATGCCTTTAATGGGACCAAGCTAGATCAAGTCGACCTTCACAGGAA TAAGTATTTGACCAAGATGGATGAAAGGGCTTTTGCGGGCGCCATCAGCGGC CCCATGCTTCTAGACGTGTCCCTGACAGGGATCAGCTCCCTGCCGACCACAG GTATGGACTCTCTACGGGAGCTGAAGGCGCGCAATGCCTGGGCCCTCAAGA AACTGCCACCTATCAAACCTTCAAGCACCTCACCATTGCCAACCTCACCTAC CCCAGCCATTGCTGCGGCTTCAAAAACCTCAAAAAGAAACGAGGCTTTTTGGA GACTTCTTCTGTAACCTGACTGCTTTCAATGACCAGCATCACAAACGCTCTG TGGGGCCCCTCCGCATGCCTTCCCTCCAGGGGACAGCGTCGTGGAAACAG TCCCAGACCAGGAGCCAAACGACGGAGGTCATAGAGAGTCCCACCAAGACT GGAGGAGAGGTGACTTCCATGGCAGCCTCCACTACCACGCCTATTTTGGGGG GCAGCCGGATGAGGATGTGGGTTTTGGAGAGACCCTCAAGAACCCCAAGAA GACACCAGCCAAGATTTTGCAGTCGTTACGATTATGTGGTGTGTGAGGAGG GAGAGGAGGTGGCGTGTGCACCAAGTCCCGATGAGTTCAATCCTTGTGAGG ACATAATGGGTTTTGGCTTCTGCGAGTGTCTGTGTGGTTTTGTGAGTCTGTTG GCCATTCTGGGAAATGTGGTGGTGTCTCCTGGTGTCTGCTCACCAGCCACTACA AGCTCTCAGTCTCCCGCTTCTCATGTGTACCTGGCCTTTGCAGATCTGTGC ATGGGGATTTATCTGCTCCTTATCGCCTCTGTGGACCTCCACACACGGGCCG AGTACTTCAACCACGCCATAGACTGGCAAACAGGTCCCGGTTGTGGACTTGC GGGTTTTTTTACAGTCTTTGCCAGTGA ACTGTCTGTCTACACCTTGACAGTGAT CACTCTGGAGAGGTGGTACGCTATCACCTTTGCCATGAGGCTGGATCGCAAG		

```

CTGCGGCTACACCATGCCGCAGCTGTGATGCTAGGAGGCTGGATCTTCTGCC
TCGTCCTGGCGCTGCTTCCACTGGTTGGGGTGAGCAGCTATCAGAAGGTCAG
CATCTGCCTCCCAATGGACACCCAGTCCACGGTGGCTCAGGTTTACATCTTGT
CAGTGCTGGTCCCTTAACGTTCTGGCCTTTCTTGTATCTGTGCTTGCTACTTCA
AGATCTACTGCGCAGTGCACAACCCTCACTACCACTCTGGATCCAAAGATAACC
AACATCGCCAAGCGCATGGCGGTCCCTCATTTTTACTGACTTCCTGTGCATGGC
GCCTATTTCTTCTACGCCATGTCAGCAGTGCTGGACCGGCCGCTCATCACT
GTCTCCAACCTCAAAAATTTTATTGGTGCTCTTCTACCACTCAACTCCTGTGCC
AACCCGTTCTCTACGCCATCTTTACGAAAGCATTACGGGGGGATGTATTCAT
CCTCCTCAGTAAGGTGGGGCTATGTCAGCAGCAAGCACAGCTGTTTCAGAGGC
CAGACGGTCTCGTCGAAAGGAAGCAGTGGGACATCTCAGGTCCGTTCGAGAC
AAGGATAAGGTTAGGAAAGGAGGAAGCGGGGGCCAGGAAGAGGTGCCCATC
CACCTGAAGAAATGCTCCGGACATGCCTACCATCAAGCAGTGAGCCAGCAGA
CAAGCCCTGAAGAGAGCCAGAGCCTGAACACGTGAGCCGAACACCAGCTTG
AAGTAGTAAAAAAGTAAGACAAGTTCAGGAGGCCTTGAAGTGTTTGTGGACAG
ATCTGTTTGGATATTTAACAGAAAGCTCCAGTATTCTGTATCTGCTTCAACTTT
CAGGCCAAGTTCAGCTGTTTTACAAATTTGGGCTGTGATGATTTTATGGTTCC
AGTTGTTGGAGGATATCAAGTGTCCCTGAAATATGAGCTCGACTTCATCTCAC
TTGTAGCTCTTTTTTATTCTGATGGACTAGCTAGAATAGAACCGATATTATTATA
AGGAAAACATAAAGATAATACACATTTAAAAAACATACACATTTAACTAGAATA
AAATCAGTTTTTTCAGTATCTTTAATTATCTTGAGTTTAATTCAAATTATGTGT
GCACAGTCTGGCATTAAAATACAGGGAAATATGACAAATTGTATTAAGTAATTC
ATTTCCAAAGATAAAGACCTTTCTGGGATAAAATATTTATACTTGGCTATTGTG
TTCAAGGACAGCCTGCTGGCTCAGTGCCGT

```

**Tabla IX.** Secuencia obtenida del transcriptoma para tiroglobulina.

Gen	Nombre	Tamaño
Tg	Tiroglobulina	9473
<b>Secuencia</b>		
TCCGATCTGAAATCTTTATTGTATTTCTGAAAACACAAACATGTTGATTTCACT GCTTTTTAAAAAATATTGATATCCTTATGAGTAAACATTCAGATCCAAGAATTCA TAGTATTTCTACTAACTGAAGTGAACAGAAAACATTTGACTGAATTACAATAT TCAGTCACCAGCTGCTGACACACACAACAACTGAACATATGTTTGTGCTGTG GTACATCACATCAGCTCAATACAGGAAACAGTCACCACCAATCAGCTTTAGAG CAGATATATTAGAGATGATATCAGTGATGTCAGACAGTCCGGCCTCGTTCCTC GGGGCGTCAGGGCTCCTCCTGACATCTGGAGGCTGCATCATCACTCGTCTCT CTGCTGCTCTGCCCTCCTGCAAACACACGTCCTTTTGTGACGATGGACGCC ACTATGATGATGAGCACCGTGAGTGCAGTGACCAGCAGCAGACGGACAATCG TCAGGTAGTCCAGTGTGGTTCCTCCGTCTGCAGCCTCCACCTGCAGCACGTA CGCCACCGAGCGTGTCCCCACTTGGCCTTCAAACCACAGGTGTAGTTCCCA		

GAATCCTCTGCGGTCAGAGGGCTGAGCCTGAGGGCGGGGCCAGACTCTGGG  
AGGAGGTGGTCACCTCTGAACCAGGTGACCTGCAGCTGGTGGAAGGTGCAG  
GTTGAGGTGCAGAGCAGTGTGACGTTCTGACCCTCTCTCACCTCTCTCTCACT  
GGAGCTCGTTATTCTCATCGGAGAACCGTCAACAACCTGTGACATTCACTCCAC  
TTTGTCCAGTATGATGTCCTGCTGCATCATTAGCCTCCATTCTGAAGCGAAAC  
GTTGCCTCGTCTCTCTCCTGTAGATTACTGATCTGTAAAGTGCAGTTTCCCGT  
CTTGTCTCCCAGGTATCTGTAGCGAGGGTTCGGGGGGTTTGGTGGTCTTTGAA  
TCACTGTCGTACACAGACGGAGTGGATCCATGACAAATCAGATGATTCTGGCA  
CCAGACGACTCTGATGATCTCCCTAATTGGTTTGAAGGTGCAGGGGAGGGTG  
ACAGTCGAGCCTCTCACAGCACAAACAGGAAGTGAATATTTCACTTTGACC  
CACAGCACCAGCCAGCAGCAACAGAAAGGCCAGGCCGTCTTCATGTTGTGA  
AGAGAGGGTGGTTCTGTTCTTTAAACTCCTCGGATCAAACCTACAGGACTGAGT  
GACCGTCAAACCTGAGGCGATGCGTTTACTGTATTTGTGGTTGTTTCTTTCTTC  
CTCTTGTTTTTGAAGAAGTAATTTCTGTAAGAAGTGTCCAAATACTTCCTGTGT  
GTCGAAACACATCCCGTCATTTTCTGTCACCTCAACTCCTGGTCTTCATCAGA  
AACTGTACGTGTGATGTCACCCACCCACAGAGAATATGAGTCATATGAACCAG  
TGAGGATAAGACGGCTCTGTCTGTCCGATCCTTTGATTTAAATTGGATCTCA  
GAGTGAAGTCTGATTCTGTGTGAAAATGTTTCGTGCTGGTCTGACAGGTGGAAA  
CGTGCCGACACCAACTCACGGGCCCGTTTGGATCAAACATCGAGAGAGCAAG  
ATCCTGTAGAAGCTCATTAAATGTTGTCAATTTCTATCCTGTATCTGTTTCTATTTA  
CTCTAGACTGTCTCATCAGCAGCAGCTGTGACCAGCTGTGTCCAGCTGTGAC  
CAGCTCCTGTCTGCAGCGGATCATGATGACGTGACTGTGATACTGAAGGTCT  
GACTCTGAGGTTCTGTGGTTCATGTGTTTCAGATGTGACTCAGGTGCGAGGAG  
CCGTTTTATTGGTCTGATTCACCTCACACAGTGTCTCTGTAAGAATTTTATGTA  
TTAAACGTCAGTATGGAGATGTTGAAGGTTTGCACGTGGTCCCTCAGGTGAAAC  
AGCTTCACTGCTCTGGAATAACAATAACAGCGTCACACTGAACACTGACCCTC  
GTCATCTGTGTTTCAGAGATCCTCTCGTCCAATCAGAGGGCTTCACGGCTCAC  
TGGCCGCCTCTTGAGTTGTGTTCAAGGACGCCTGGTTCCACCATGATGGACA  
GGGAAGAGGAGGGAGGAGGGGTGAAGGTGTGTTGTTTGGTGGTTCCTCCTC  
ACGGTGACTCAGCAGGTCTGCAGGTTTATAACGAGGCAGAGATGCTCAGTCT  
GTCACCGCGGAGACGATGGCTTGGCTGCTCGGCATCACCTGCATCCTGGTCT  
GCTGCCCGGAGCTGCTGCAGGGCAAAGCTTCAGAGTATCAGCTGGAGTCAG  
AGACCCTGAGCCAATGTGAGCTGCTGAGGGGAGCGGCTGTTGCCAAGCAAC  
AAAGTGCATCCCTCACTGTTTCAGAGGATGGCAGGTTTCAGACCTGTGCAGTG  
TAGTGGGCGGGGTCAGGAGTGTGGTGCCTTGATGCTGAAGGTCAAGAGGT  
CGTCGGGACTCGAACCAACAGCTCTGCGCCTGACGTCGCTCGGTCCCTGTGC  
GTCTCCCTGCCAGCTGCAGTCGGTGTGCGGTGTTCTCCTTCAGGTGTGTTT  
GAGGCGGTGCAGTGC GCGTCCAGCAGGGGGCAGTGTGGTGTGTGGATCAG  
GACGGCATGGAGCTGTACGGGACGCGACAGACCGGGAGACCTCAGCGCTGT  
CCTGGCAGCTGTGAGGTGAGGGGGAGGCGGCTCCTCCAGACTCCGGATCT  
CCCTCCCCTCCTCAGTGTGCAGCCGACGGAGGCTTCCTCCCTGTTCAAGTGTA  
AATTCATCAACATGACGGACAGGACAGAGCTGGACCTGCTGCACGCCCTCAA  
CAGGTTCCAGAAAGCCTTTGAGACATTCAGCAGTTTCAGGAAGTTGTTCCCGA  
TGGTTTCTCGTACTGTTTCTGTTTCAGACAGCAGAGGCCGAGAGCTGGAGAG

CACAGGTGTGGAGCTCCTCCTGTGCGGAGGTGTACGACTCTGCGTTGCTGGT  
CTTCGGTCTGGTCGCTCCTTCTCTCAGACCAACATCTACAGAGTCCTGCAGAG  
GAGGATGCTGGGAGTTCGCCTCGCCCTCACCGGACACTTCAGATGTCCCTCT  
CCCTGTGAGGAGGAGCGGCGGGCAGCGATGGCGGGCGTCCAGTGTGTTTGT  
CCGTCCTGTGAGAGCGGAGGCTCCTTCACCTCCACACAGTGTGAGCAGGGG  
GGGACGTGCTGGTGTGTGGACCCACAGGAAGAGAGCTTCCTGGGACACGA  
CAGCACGGAGACGCCCTGGTCTGTGGTTCAGGTCTTGCTGACTGTCCCTCT  
AGCGTCGTCTGGCTCTGTCCCGTTCTTCTCTGGTCCTGTTGCTCCTCCTCTC  
TTTGAGGCCTCCTCTGGCAGACCTCCAGCCTCCTGTCTCTCCCTGCTCCGGC  
CTCTTAGAGATCTCCTGCCGGCGGAGGCGGATCTGACCTCCTTCCCTGTCTCA  
CCTGGTTCGAAGTCCCTCAGGGCCTCTTCCCCTCTGTGGGAGGGGCCCTGCA  
GGCTCTGGCTCGCGCCTCCCCCGTCGCCTCCAGGAGAACCTGTTCCGGAGG  
GAAGTTTCTGAAGAACGCTGCGGCCTTCAACCTCAGCGGGGCGGTGGGACC  
TCGAGGAGCTCCGGGCCTGGAGCGGCTCTTCTCTCAGAGCGGCCTCCAGAA  
GAACCGGGACCTGGTCCAGACCGTCAGCAGAGCCCTGGAGGATCCTGCCTT  
CCTCTCCGCCCTCCGACACACACTGACGGGGCTCAGCGGCTCCGCCTCAGT  
GCAACAGGTCTGACTCCTCTGCTTCGTTCTGCTCTGGTGAGGAAGAGGAG  
GAGGATGCAGCGGCCATCTTTGTTCCAAGCTGCACGTCCAACGGTGGTTTCC  
AGGAGGTTCAAGTGTGAGGGCGGAGAGTGTGGTGCCTCGACGCTCAGGGTC  
TGGAGGTCGCAGGGTCGCGGACCTTGGGTGCTCGGCCTCGCTGTCCGTCCC  
GCTGTGAGAGAACAAGAGTGACGGCGCTGAAGGTGAAAGGAAACATGGCAG  
CTGGAGCTGAAATCCACATCCCAGCATGCTCAGAGGACGGAGACTTCCTGCC  
GCTGCAGTGTGTCGGGTACGCTGCTTCTGTGTGGACGCTGAGGGGAAAAC  
AATGACTGCAGGGCCAACAGGGGGCCCCGTGAGCTGTCCAGAGAGAAAAC  
TCAGAAGCTCCAGTCGTCTGCAGGTGGGTGCTCTCAGGTGTATGCTGAGGTC  
ACAGCGTTCAGAGAGGAGGTGAAGAGCATCATCACTCTCTCTAACTCCTCCC  
ACCTGCCGCTGGGATACGGATTCTATTGGCTGAAGGTCTGCGTCTGACGCC  
CGAGGAGCTGCAAGTCAGCCAATCAGAGGAGGAGATGCAAATTTCTGATAGC  
CTGCTGAGCCGATCCAGAGCTGCTCTGCGATTGGCCGCTTACTCCACTGTCC  
AGATGTTCTGCTCCTCACCGTCGTTCTACCAGCTGTTCACTCCTCAGTGT  
GATGCTGACGGACGCTGGCTGCTCACTCAGTGTTACCACAGCACAGGTCAAT  
GTTGGTGCCTTGTGATGAAGATGGAGAATACATCACTGACTCACTGAGCAGCCG  
CTCACTCAGCCTGCCCAAATGTCTGACTCGCTGTCAGAGAGCTCAGGCTCAC  
TCTCTGCTCTCTGGTTGGATGAAAGGCTCTGACGTCACCACAACCTCACCTTA  
CCACCCGAAGTGTGAGGAGGATGGTCGTTACTCTGTGCTGCAGACAGGAGGT  
GCTGCAGGCTGGTGTGTGAACCCTCTGACCGGAGAGACGTTACAGACGGCA  
ACACCGAGCGCCGCCGGACAGCTGACATGTCCAGCTGGTGTGAGCTGCAG  
GGTCTCCAGTGTGCGCCCGATGGCTCCTTCATCCCGTTGCAGTGTGATGTCA  
CTTCCTGTTGGTGTGTCTCTGTGGACGGACAGGAGGTGGGCGGGACCAGGA  
CACTGCGACAGACGGGACGGACGCCATCATGTGATCGTCCTCTCTGTCCAGA  
CCCTGATGTTACCATGGTGCCTGCTGCGGCCCGACGGCCGATGGTCG  
CCAGAGCTGTGATCTCGTCTGTACCGTGGTTACCACAACCTCACTTCTGTCA  
GCAGCTTCTGTGTGAGACTGGGAGTCGGCGATGGAACGGAGAAAACAAAC  
CTCTGAGTGGAGCCTGTCAGATCTCTCAGCCCCTGCAGTCTGTGTCGTCCTC

TCAGCTCTGGTTGTTGTCGTCGTCCTGCTCTCAGATCAGCAGTTTACAGTCTG  
TGTTGTTTCAGCGCGATGACCAGCAGGGGGCTCTGCTCCATACAGCTCCCCGT  
GTCAGGCCGCTCCGTGTGCGGTGTGTGACGACGCGTCGGTGCGTCTGCAGTG  
TGACGGTGACGAGTCACTGAAGTTAACAAATCAGATGGAGCGCCGCCCTCTCT  
GACCTCCCCGACCTCCATGACATCGGTCTGTTCCCTGAACGAGTCCAGACTCC  
TAGAAGGAGTTCGGAACCTTCTGGGTAATATCCAGTCCACGCTCACATCAGA  
GCCAAACTGGTTTCTACGACGACACCAAGCTTTGGCTGTTCCCATGGTTACC  
GGCTGGCCAGTGACAGTGAAGGTTGCGTTGTTTGTCTGCTGGGACTTTCTC  
CAGGGAGGGGGCGTGTCTTCTGTGTCCTCTGGGAACCTATCAGGATGAAGAG  
GGGCGGGATTTCTGCAACAAGTGTCCAGAGGTTCCCTCACCTGCTGGAGCGT  
CATCTGTCAATCAGTGTGTGACGGAGTGTGAGAGGCGGGGCCCTGGGGTGT  
CAGAACGTGGCAACTTCCTGTCAGCGCAGCCTGACTTCCTGTCTGGCAGGTG  
GAGGTGTTTCAGCAGCGAGGGGGCGGAGCTTGAGTGGACCATCAGCGACAA  
ACCTCTGACTGACGAGGAGTGTCTAGTTCTCAGCAGGTTTCAGGCTGTTCC  
GGATCAGATTTGATTTTTGGAGCTGAAGATACTGAAGTCTTGAAGACGATGAC  
CTCTGACCTCAAACCTGTGTCCAAGCGTGCAGCAGCGGAGCCGTCCCTGCCAC  
CATGTGGCGCTGTTCAACACGCAGTGTGAACTGTACAGCACACACACTGA  
ACACACTCTGCAACACCTCCCAGCAGACTAGTGGGTTTCTGGGTAATCCTCA  
GGCCGAGATGTTTGATTGGCTGAGCTGCTCTCTTAGAGTGAGGGGGCGGAGCT  
TCAGATATGCTGGTCATCAGGAAGAAAGGGGCGGAGTTTTCTCGCAGCAGC  
AGCAGCAGCAGAGGTTTGTGAGGATGACGATGAGGAAGGTGATCTCAGGTGT  
GTTCAGGACTCAGGTGTTCTCCGGACGGACCTCCCTGTCTGACGCTCATCGT  
TTCTGTGACGAGCGGCTGCAGCCGCGACACCTGCTGCGACGGATTTCATCCTCA  
ACCAGAACAGCCTGAACGGAGGTTCTCTGCTCTGTGGTTGGCTGAGAGCTCC  
GTCGGTCTTAATGTGTGGTGACCAGGACTGGGATGTGATTGGACAGGGGAACA  
GCCAATCGTATCTGTGGGGCGGAGCTAATCTACAACATGCAGCAGGGGACCT  
TCGTGTTGGACTTTGGAGGAGAGACGTTCAACCATAGCTGATTCTGCTCTGCC  
CGCCGACAGTAAGAACAAGGACTACCAGGCCTCCATCGTCAGTTCCAGGCC  
ATCTACCTGAACTCTGACCCAGCAGTCGCTTCTGGTTCTTCATCGTGTGCAGC  
AGCAGAAGTCAGTCCCTCCTCTGGACGGGTCAGTGCAGCAGAAGTTTGAGTCT  
CTGTGACAGGACGATGTCCTCGTGGATCCTCAGAGGAATCTCTCCACACTTTC  
CTTCTGGCTCAACAAAAGAACTACAACCTCCAGCAGGCACTGCTCTGGTGTG  
TCTCACGTTGTGACGAGGAGCAGCGCTGCTCTGTCGCCGACCTCAGAGACG  
CCGACTCAGCAGGTTTCTTTCAGCTGCTCCTTGTATCCCGACAGCAGAGTTTGT  
GGAGCGTACGACAAACCACTGAGACGACCCTGCCGCCTCCTGCTGGACAGA  
ACGCCCAACAACACCCACAGCAAGAAGGTGGATCTGTCCGGACCAGTGAAGA  
GTTTCTACCAGAGAGTTTCTTCCAGAAGATGGTTTCTTACTCCGTCCGCAGC  
CGAGTCAGTCTGAGAGACAACACACCGCTGTCTGAGGGGTTTCATGGAGTGTG  
AGCGGCGTTGTGATGAGGATCCTTGTGCGGTGGTATCGGCTTCGTCCAAGA  
CACCAAATCACCAGGTGGTTCAGACGTGGTGTGTCTGTCTCTGATTAGTCTCG  
GGTTCAGACCTGTGGTGAAGACGACACGACGACCTGGAGGACTCAGGACT  
GCAGACCATCTGTAGTGAAGACCACACCAGACCCCTTCGGCTGGTACCAGAA  
ACCTGTGAATCAGTGGAGTTCTTCTCCTGCTCTGTGTCCCTCATTCAACCTGC  
CACCAACCAGAGACAACGTGTCTCTGGACGAGTGGCGTCTCCTCCCTAAATC

ATCAGTCCTGGTCGACCCGTCTGTCTCTACGTATGATGTCATCCATGTAAGCC  
GTGACATCAGCACTGACCGGGACAAAACCAGGGACTGGTGTCTTCATGCCTG  
CCAGGAGGCGGAGTCTTGTGTCGCCGTGTCACTCCGTGAGACGGAGTCCGC  
CACTCGCTGTGTCCTGTACCCTGACACCACAGCTTGTGGGCTAAGCTCCGCC  
CCCGGCTCCTCCAGACCCACCACCTCCTGCAGGCTGGTCATCAGAGAGCCC  
GCCCCTCACGTGTACCTGAGGACAGAGCAGTTGCTGCCGGTTACGACCGTCT  
CCATCCCAGGTCATGGGATCCTGCAGGGTGTGGCCGTGGAAACAGCCCTGG  
GCTCAGAGCGGAGGACGGTCGTTTCAGTTTCTGGGAGTCCCATACTCCCGTCC  
ACCAATAGGATCACTCCGTTTTGAAGAGGCTCAGCCAGCTGATTGGACAGGA  
ACCTTGGACGCCACCAACCACGTCCCAGTTGTGTCCAGCCTGGAGACATGG  
AGTCTCGTCCTCCAGTGAGGACTGTCTCTACCTGAACGTCTTCGCTCCTGCT  
GCTGTGAGGGGGCGTGTCCCAGTCCCTGGTCTTCTTCTTCAACCCGTGAGCCA  
ATCAGAATCCAGGATTGCTGGATGGCTCCACCCTTGCTGCTGTGGGCAATAT  
CGTCGTGGTAACAGCAAACACTACCGGACCGCAGCCCTGGGATTCTGAGCACA  
GGTGAGTCTGGTCTCCGTGGTAACTACGGGCTGTCGGACCAGGAGGCGGTG  
CTTCACTGGGTTAACGCCACATCTCCCTGATGGGCGGAGACAACAAGAG  
TGACGGTGGGGGCGGAGCGTCGTGGTGTGACATCACCAGCCATCACCTCC  
TCTCCTCGTCCTCGCCTCCTCTGTTCCAGCGCATGATGCTGATGGGCGGTTT  
TGTGTTTTCTCCATCACTGGTTCAGACTCCCTCCTCCTCCAGGCGTCAGGCGC  
TCGATCTGGCTGAAGAACTGGGCTGTGTGACCTCTGACCTCGCGGCCTGCCT  
CAGAGCAACACCTGTTTCATGCTCTCAATGCTGCTCAGACCAAGCTGTTGGCG  
TTCAGTGGTCCATTCAGGTCCCTGGTCTCCGGTCCGTCTGTCGGACTCCCTGT  
CCACCTTCTACAGAGTCGATCTGCTGCTGGGAACATCAGAGCATGACGGGCT  
GATCGGCCGAGCTCGCAGGATAAAGGACTTTGAGGCTCTTCAGGGGCGGAGC  
TGATGGTAAACAGCGTTTTATGAGGCGCTGAGTCGCTCGCTGGGCGGAGAG  
AAAGGAAGTGACATGCTGAAGGAGGCGGGCGGCCTGGTTCTACTCTTTGGATC  
ACAGTACTTCACCTGCAGGATAACAACCTGTTCTCCAGAGCGCTCAACAACGC  
CACCAGAGATCTGTTTCATCGTCTGTCCCACGCTGCAGATGGCTAGCCACTGG  
GCTAACAGCAAAGCTAACGTCTTCCTGTATCACCAGCCC GCCACAAGCGCTC  
ACGACAGGGCCGATGTGTTTGTTCCTTTGGATGTTTCAGCTTGTGTTCCGGACT  
CCTCATCATCCAATCAGCTCTCAGCGTTTCACCTCCTCTGATCGACGCCTCTC  
TCTGGCCGTGATGACCTATGTCTCCAGCTTCGTCAGGACAGGTAACCCGAAC  
CTGTCCC GGGTGTGGGGGGAGTCAGTTTTGCCCGCTGGCAGCCAGTCCAG  
TCCTCTGAGGCCCCGCCAGCTACCTGCAGCTAAGCCCCGCCCTCGTCAATC  
AGCAGGGTCTGAGTCAGAGATCCTGCTCATTCTGGAGCCACCTGGGACCCAG  
ACTGATGGGACTGACAGGTGAGTCGGGGGCGGAGCCTGTCCAACCTGCGCT  
GACCCCTGAGCTCCAGTGGCCTCACCATCCAGCCAATCACAGGCAGAGAAA  
GACGCCTACAGTTAAACAAATGACATCACAGCATCAAGAAAAACAGTTTTTTGTT  
TCTGTTGATCCAGTTTCTTCTAAATCATCAATAAAAGCATCTTAAACTC

**Tabla X.** Secuencia obtenida del transcriptoma para Deiodinasa tipo 1.

Gen	Nombre	Tamaño
Dio1	Deiodinasa 1	2834
Secuencia		
AAAATGTAATGCCATTTTTACTTTTCGCCAGGGAAGCTGATGATGTTCTGTGTG GTATATGGCTATATCTCTTCTAAAGGGATTTCCAATGTACAGTACTGGGAG GTCAGGGAAGACGTAGGAAAGGATCGAGGGGACATTTCAAGGAAACGGAAC ACATGGTCACTTTGCTGGGCAACTAAAGCGCTCGACAAAAGTATTTTTGCAGT ATAGAAAGTACGAGCTCACAGAAAGGCCTTGAAGGCAGCTGTTATCAAACATG AGCCGAGTGGGCGGTAACCGACATCTTTAACAAATCAAATGACAGTTTTGCCAG AGAGGCAAGGAGAGAACGGGACTTCACCATCAAGGAGGAAGTATGTTTCTGC AAAACTGCTGCTCTATTTTTCGACAGCATGCGTGTGTTTCTACATGATAGCAC TCAATATCATAGTCAGGATTATGCATTTTGTTCACCAAGCCTCACAAGAAGC AAATCCTCAGAATGGGTGAAAAAATCACCATGACCCAGAATCCCAACTTTAAG TATGAAGATTGGGGACCGACGTTTAAATCATTCAAATTCATCAAACCGCATCT CTGCACATGTGGCTCTCCCTCGGACAAGAAGCGTTTGTGGGAAAAGAAGCTC CGGACTCACCTGTTGTCACTATGGACGGAGATAAAACAAGTGTGTTGCAAGTTC TTGAAAGACAACAGACCGCTGGTGCTGAGTTTTGGAAGTTGCACCTGACCCC CGTTTATGTACAAACTTGATGAGTTCAAGCAACTCGTCAAGGACTTCAGCGAT GTGGCTGACTTTCTGGTGGTCTACATCGCCGAGGCACATTCAACAGATGGTT GGGCCTTTACCAACAACATTGACATCAACCGCCACCGGAGCTTGGAGGACAG GCTGTCTGCAGCACAAATCCTGGTTCAAAGGAGCCCTGTGTCCGGTGGTT GTGGATGAAATGAATGATGTCCTGCCATAAAGTATGGCGCTTTGCCCGAGA GGCTTTATGTGCTACAGGCTGGGAAAGTCGTCTACAAGGGGGGCATGGGGC CTTGGGGCTACAATCCAATGGAAGTGCGTTCATTCTGGAGAAGATGAAATAA GAAGATTGTTAATTCAAGTCAAGGCATGTAGCAATCATCTAACCAGTCTTATAA TGGACGGAGATCTCTGTGTTCAAGTAGGGAATGGGAAGGGTGGAGGGGTGTT AACATTTTACATCAACACCATATATTACTGATCCTTTCTCAGTTTTATTTTTTAC ACCACTCAATACACTGCCACATCTACATGTGGTTCTATAGCTGTTCTCCATCTC TCATATCAACCAGTGCATGAGTAGATAAATATTGCAACCCCTCCAAACGTGCA CTAACAATGCCTCCAGACTCTCCTGCACCCTGAAAACCTGACCTCAGCTGTCGA CCCCTGGCCTTGAACCTCACGTCTCAGTGTGTTCTTAGTGACGACTACAGATTAA ACCACAGGCCTCTGTAGCCAGATGAAATGAAACACAGAGAGATGGTCAACTC AGAGTTTGTGTTTGGAGGTATCATAACATGCAGGAGATGTTGCGTGTCTCTATG TGTTTGTGTGTGATTTTTTTCACTTAAATTGTCTTAATTCTAAAGTTTGCTAGA AGTTTAAAGACAAATCCTGAAGATTTAAGTCAAGTCAAAGCATTTTTTTCCATGA TATTTGTCTATAAATGCTCCAAGGTAATTCAACAGGAGGCTGCTTTTCTACATG ATGATTACAGTGCAAACCTCTGGTAACTGTAGTTTGATAAAAGATCACTTAAAG TAGGTTTTCTCTGAATGACTGGACACATTTAATGTACAATAAGCTCTGTCTACA ACAAGTCTTGTATCAGAATAAATTTGCTTTTCACTGTGGTTTCATTCAGGAATG TTTGAATTTAATACTAAAAAACAACCTGTCTTATGTTAGCTAGATTATCAT CCATCTCATTATGTTTCATGAATGATCAAATTGTTGCTTTCACAGTAAATAATTA		



```

AAATGAAAGGCATCAGAACTGTGTGTAAGCCATTGTTTGTCACACATCTGTAG
TTGGTAGTAGTCGCTGTGATTAATCCTCCCCCCCCCGACCTATTCAGACAGA
ACAAGATTGTCTGCGAAGTTACAGAGGTCTTCATATGTAGATCATGGTTCTTC
ACAGAAATTGGCTGCAGGTCTTTAATGTTGACACACACGGCAGTCTCCCACCA
TGTGAGGATCTGACTGTTGTTTGCTGTCTGGTCTGGATGTGATAGACGGTAAA
CATACTGTACTGTATGTCTGTTCTGCAAGTTCAACGAAGCCACTGCGCACACA
TACATGCATGTGAGTTGTGTGGTGTGGCATGAGTTAATACCTAACTGTGTCAC
CTTTGCACACGGATTGATTTTGGCTTAGATTATGTGTGGAGAAAATGTCACTCT
CACTACAAAACCTGCTTCTGTGTTAATTTAATTCTTCGAAAGTGTTACATAACAG
TCTGTCTATCTGTCTCTCTAAGTCTGTGGAAGTGGTGAATGAGCACAAAATGG
CCTGAACTGTATTGAAAATGGAAAGTACTGCTGATGCTACACTCAAAGAGATT
AATTTCTCTAATTTCCCTCAAGGGAAGACTAATTAGACTCCCAACTGTTTGACA
GTATTTTTATAATCTGATTCATTGGCTCTTCTCTTGTCTTTGTTAAAGTTTTTGC
TGCTTCTTCTCCACATTAACAGCACATTAATATTAATTTGCTCATGTATTTGG
GTACATTTTAATGTTAGTTCTCCTATAATATTTTAATGATCCCAGCAATAAAGA
GCAGCATTGACA

```

**Tabla XI.** Secuencia obtenida del transcriptoma para Deiodinasa tipo 2.

<b>Gen</b>	<b>Nombre</b>	<b>Tamaño</b>
Dio2	Deiodinasa 2	2432
<b>Secuencia</b>		
AAGGAGGGGACAGTGGGTATGCTGTACTTCTGACGTCAGAATCTTGCTAAAA AGATAAGCCACGAAGTTTAATATGAAGTACAATGTTTCGTCCTTTTAAGAAGAGT GATTGAGCTCAAGCACCTCCAGCGCTGAACACTTGAAGGGTAACATAACAG ACAAGAGATACCTGGTACACCTCCCTCATATATGCTCAAAGCAGAGCAAAAAC TATGAGGAGAAGCTGAGTCTTGCFTAATGAAGGGTACTCTGAAATAATTTGCC TGCCGCCATAAAAGCAGAAAGGGAAAATGGGGATGGCGAGTGAGGATCTGCT GGTGACACTTCAGATACTACCTGGTTTTTTTTCAAACCTGTCTGTTCCCTGGCCCT GTACGACTCCGTGGTGTCTCGTGAAGCGAGTTGTGTCTGCTGCTCAGCAGCTCC AGATCTGCCGGTTCCGGAGAGTGGCGCCGTATGTTGACCTCAGCGGGGCTC CGCTCCGTCTGGAATAGCTTTCTTCTGGACGCCTGGAAGCAGGTGAAACTTG GCTGTGATGCACCCAACCTCTAAAGTGGTGAAGTGCCTGATGGCCCTCGGTG TAGCAGCAATATCAGTAATATGACCAATGTGCCGACTGGAGCCAGGATCCGG AATGGGGTGGAGTGCCGCCTTCTGGATTTTGAGTCATCAGACCGCCCTCTGG TGGTTAACTTTGGCTCAGCCACCTGACCCCCCTTCATCAGTCACCTGCCAGCT TTCCGGCAGTTGGTAGAGGACTTCAGTGACGTGGCTGATTTCTGTTAGTGTA CATTGATGAGGCTCACCCATCTGATGGCTGGGTGGCCCTCCTATGGGCTCT TACTCTTCAATGTACGGAAACATCAGAACCTGGAGGAGCGGTTGGGAGCAG CACGCAAACCTCATTGAGCACTTCTCACTGCCGCCACAGTGTCAGCTGGTGGC TGACTGTATGGACAACAATGCTAATGTGGCTTACGGTGTGTCCAATGAAAGGG		

```

TGTGTATAGTACAAAAAGAAAGATTGCCTATGTGGGTGGTAAGGGGCCTTTT
TTTTACAATCTGAAGGATGTGCGGCAGTGGCTGGAACAGAGCTATGGTAAAAA
GTAGCTGTAATCAAGGACGAGTATGGAGGAGGACATTTCCCTTGTTTCAGTTG
GGAAATTGTGTTTGAGCATAAAAAGGCAGAAATGTGAAGCAAAGCACACCAG
TCTGTTCAAACCTGAGATGAACATGTGTAACAACCTTGTGCTAATGATGCACATG
AAGTTGATTGGAAGCAACATAAGAAGGTGACAGTGTGTGTGCTTCAACTGTAT
TTATGCCTGTTTTTCATGATTTCCATTGAACTTAAAAACCAATAACTGAAATAG
GGAAGAAATCACAAGTTCCTGTTTTATAAATATGTTTGCTAAAGGAATAGGTTT
TTAATTATTTTATGAAGATTTTAATATTTGAAATTTTTTCAGTGTGGTCATATATT
GTTATGCACTGTGTCAACAACCTTAATTTTATGTGTTATCTTTATATAACCCTCATT
TGACAGCTCTATAGTGTTTTTATTTTTTTCATTTTCATTTCCCTGCTTATAAGAA
GCATTTACCCCGTGGGAGTTTTTCATGTGTACAATAGTGAATCAAAGTAGATT
TAATGTGGCTTTTTGACAATGATCAACAGACAAAGACCCTTTAATGTAAAAGTG
AAAATCTTAGTAGAGTATTCAAGCCCTATAAGTTACTGTTTGGTAAAGTTACAA
CCTTGAGTCTGTATGGATAGGTCTTGGTAGGTTATGCTTCACTGGACATGGCT
CTGTTAGGTTGTATGGAGATCATGAGTGAAGTGCCTTTTTCAAGTCCAGCCAC
AAATTCTCAACTAGATTCAGATGTGGTTTTTCACTCCAGAATATTACTGTTGTT
GTTTTTAAGCTATTCCTGTCTAGCTTTGACCACATGCTTGGGTATATTGTCTTG
CAAACAACCCCAAGTAGGTTTTACTACATTCATTTCAGCCTGCTGCAGAGAGG
TAACCTCAGAGCATGATGCTGCCACTACCACGCGTCATGGTGGGAATTTTATG
TTGATGGCATTTAGATTCTGATTAATACTTGATCATAGGTTGTTATAAATGTTT
GTGTGGCACTGCCTGGTGAATATGGCTAACTTTATCTTCTGTCAGTAATGTAT
GTAACAAGACATAACAAGTTTTTAATGTGTCATGTTTCATGGGCTGCTCTGATGT
GTAGTTTTGTGCACTTATGTTTAATTATTGTGTGTGGATTTGGTGTTAGATCAG
AAATTCTCAACAACCTTGGTCGTGCAGTGTTGATTACTGGACTTTACCCCTTGC
AAGCACATTCAGTTCAACAGCCTCTCTCATTTCTGCCAAATAAAACTGATC
CCCTCTGTCATCAGTGTGCAGCGAAGACTTTACTGCCCTT

```

**Tabla XII.** Secuencia obtenida del transcriptoma para el receptor de hormona tiroidea alfa.

Gen	Nombre	Tamaño
Thr $\alpha$	Receptor de hormona tiroidea alfa	6081
<b>Secuencia</b>		
CAACCCCCACCTGGCCCCAGGGCCTGCCGATTTACCCACAGCAGAACCTC CACCATCTTCCATATCTTGCAGCTTCACACCAAGCTACAGAACACCCAACCTC AAAGGGGGTTCAGCTCCTTTTGGAGTCCCCCCTCCTCCCTCCCAAGCCCCCT GGGACGGGACCCTGTCATGTTTCACTGACTGACCCTTCCCAACCGGCGAATG ACAAGTGTGCATCCGAGGGTGGGGCTTGCCTCAGTCTCTCATAATTGGCTGC TGGATGGAATTAAGGTGAATGGAACACATGCCCAAGGAGCAGGACCCTAACC		

CATCAGAGGGAGAAGAGAAACGGTGGCTCAATGGCCCGAAAAGGAAGAGGA  
AGAACAGCCAATGTTTCGGTGAAAAGTATGACTGGGTACATCCCCAGCTACCT  
CGAAAAGGATGAGCCATGTGTGGTGTGTGGCGACAAGGCCACAGGTTACCAC  
TATCGTTGCATTACATGCGAGGGCTGCAAGGGTTTCTTCCGCAGGACCATTCA  
AAAGAACCTCCACCCCACCTACTCCTGTAAATATGATTGCTGCTGCATCATCG  
ACAAGATCACCCGCAACCAGTGTGAGCTCTGCCGCTTCAAGAAGTGCATTGC  
AGTGGGCATGGCTATGGACTTGGTGTGGATGACTCGAAGCGGGTGGCTAAA  
CGGCGCCTGATTGAGGAGAACAGGGAGCGACGCAAGAAGGAGGAAATGGTG  
AAATCCCTTCAGAACCGTCCAGAGCCCACCGGGGCCGAGTGGGAGCTGATC  
CGCCTGGTGACGGAGGCCATCGACACACCAATGCTCAGGGCGCACAGTGG  
AAACAGAAGCGCAAATTCCTGCCAGACAAAATTGGCCAGTCCCCGGTTGCC  
CCACATCAGACGGAGACAAGGTGGACCTGGAGGCCTTCAGTGAGTTCACCAA  
GATCATGACCCCTGCCATAACTCGCGTCGTCGACTTTGCCAAGAAATTGCCCA  
TGTTCTCAGAGCTGCCTTGTGAAGACCAGATCATCTTGCTGAAGGGCTGCTG  
CATGGAGATCATGTGCTGCGCGCCGCTGTACGCTACGATCCCGACAGCGA  
GACACTGACGCTAAACGGCGAGATGGCTGTGAAACGTGAGCAGTTGAAGAAC  
GGTGGGTTGGGCGTGGTGTGCGACGCCATCTTCGATTTGGGCAAGAGCCTG  
GCTCAATTTAACCTGGATGACTCGGAGGTGGCGCTGATGCAGGCCGTGCTGC  
TCATGAGCTCAGACCGTTCAGGGCTGACCAGCGTGGAGAAAATCGAGCAGTG  
CCAGGAGGCCTACCTGTTGGCGTTCGAGCACTACATCAACTACCGCAAGCAC  
AACATTCCCCACTTGGAGTGTCCAACGAACCTTCCCTCCGCTATTCTGGA  
GGTCTTCGAGGACCAGGAGGTGTGAAACACAGATGCCACCAGGCAAAGGGA  
AGAGGAAGTTGGGGCAAACCTGGGAGATGGGAAGGGCCATCATTTTTATAGGG  
GAAGGATGGAGGGAGAGTCCTCTCGGCAGGAATCGGCATTTCTCTGACATCA  
CATTTACAGTATGTGGATTA AAAACTGGAAACAACAATAACAGAAACAACACAC  
CAGCAACAGGAGAGTCAAGCAAACAGGATTTTGT TTTTGAACACCCTCTCCT  
CCACCTCTTTCTCCTCCTTTTACTTACCCCTATTTCGAAATCCGTGTGGGGGC  
CCTTCTGTCTGAGCATGATGTCTTATCTAGCAAGAGTTGTAGCCATTTGCCAA  
GACGCGCACACAGACACACACAACACATGCGCACGCACACACACACTCACAC  
CACACACACACACAGCCACAGCCTGTTCCACCTCAGTTCTTCAGAGCAGC  
ACTCTTTGCAGGGGTCAGTTCCCCCTCTCTGGTTCTTTGTAGTGGTCACAGA  
TTTACACACGTTTTGAAGCCCGTGTCTCAGCACCTCTCAGTATTATTTCTGAAT  
AAGTGT TTAGGCAGTAATTCAGAAAATATGGTCAACGGTGACATATTATCACA  
CTCACAGCAGGCACACGCAATCAGCAAACACTGCACATTGAAATTTAGTAGA  
TGCTTTATTATTCTGGTGTATAATGGCCGTAGTAATGCTACCAGACCTAGTTAT  
TATCAATTTCTCAACTCAATCTGAGCCGTTACAGCTGTTTTTGGAGCTTCTTCT  
TCTTAGATCCCAGTGAAACCGGTGCTATATTTATATAAGGCTACTCCAGTTTTA  
TGAAATTGTGTTGTCTACCTTTGAAAACGTGCAGACCATGGCTCCATATCTA  
CCTTCATTTTTGTCATTGGACCGGCTCCTGTGACATACAGTACGTGCACACAC  
ACTCACAGACACACACATGAGCAGACTTGCCTAGTCATTGCCCGTGCTGCTT  
GTGCCAGCAACCTAGCGTCTTATGAATGACAATTAAGCCCTTCTCTCCAAG  
GAGTTAGTGCATTGAAGAAAAGAAAAGAAAGTAAGTAGAGGAGAGAAGGAGAC  
ACTTGAAGCCGAGAGGAGGGAGGGGCAGAGATAGAGGGAGGAAACAAGAT  
TTAATAGCTGGACTGTGGATT CAGAACCAGGGGTTAGAAATAAATCTCCCAA

CTAGGCCTCCAAAGAGGTTTTGAATAGCAGCAACCACCAGCAGGACAGCAAA  
GCTCATCCAACACACACATTCACTTTCTCTCTCTCTCTCTCTCAACCTAAAT  
GACGCCTCTTCAGAGGCAACTTAACAACCTCTTTTAGTCTCATGCACTTTACCAA  
TGTTCCCTCTATAACAGTAATATATCCTGGCAAATATCCGTGGCAGATATCAT  
AGTGTATTAGCCAAACAACCATTCAAGAATGTTGATTTGATCATAAAAGCCCAC  
TCTGTTTATTCCAGTTCTGGGGCCAAGCCGAATCTAACTGGCTTTACACCTCC  
TACAAGAAGAGAATGAAAGAAAAGAGACTAAGAAAATCTATTTTATATTCAATG  
CCAAGCAGTAGTTCATACTGGGCCTTGTACAGGATGGGTAACGTGCACCCC  
TTAGAAGAACCTAAGCAGATGAACGTGCGCCAGGGATCGTGGGTAATCGTCA  
CAGATGGCCACGCCTAACTGCTTCAAACGCGTGGAGCAGTGCTGGTAGGAGA  
GAGGAACCTGGAGCACCCTTCGGGCACGATGGCAGCGTCTGGTCTGAATCC  
CTTCCTCAAGCACATCACCGCTTCCAGAGATCGATCACCTGCCCTGCCCTAC  
CTTACTCCAGCCCATGACGGTGCCCTTTCTGGAGCCTAGCTCAGACTGAATT  
GCACCCACCACCATTATAACAGCCCCCACCAGCCAGGCTGGAGGGAGTTT  
TTGCACTACTGCAGCGGTCTCTCTTTTATCCCCTTACTCCTCAAAGTTTAACC  
AGTGTCCCTCGTTGGATTACACATTAGTTCCCCCTCCCTCACCTCAAATGGGC  
ATCCTGACCTGCTCTGTGTAACAGAGGCTGGCAGTTGCAGTGGGCTCAGTCC  
CAAACCTGTCTTGTGTCAGTATTAGACCAACAGCACATAAACCTCATCCCTTA  
CCCAACCCAAACAGGGGTGGAGAGAGATCCCTGAGTAGAGGAGTCAGGAGG  
GCTGTGTAGCACTTACTCATTCTCCTTGTAGTACTCATTTTCCCATCATCCCTC  
CTGCAGCAGCCACCCCCCAGCTTGGCCAGAATCATTGACACAGAATGGGA  
TCCAGGCCTCTCCCTTGTGAGACAAGGCTGGCCATAACTGCCCTTTAGAGTG  
GCGCCACCGAATGAATGTGAACGGCAAAGCAGCAGCGGCGGGAACAAGACA  
CTTGAGCGCGAGAATGTGAGGATGCGAGAGAAGAAGAAAACGCGGGACAGG  
AAACAAAAAGCAGAGGGCCTCGACCCTCACTGCCATCACGGACATGGGTGAG  
AGAGGGCGATGTGGCTGGCTGTAGAGACGATGTTAACGAACACTCGGAGGA  
AGGGGAGACGGCGTAGTAGAAATATCTACGGTCTCCCCTTCAGTTCCACAA  
CAGCCTCCACACAAGCCCCCGCTCCTATGCCAGCTGACCACCCACATGTC  
CCCCTCCCCCCCACCTCAGCTCCCTCAGAAAGGATAACCTCCAACCTTTGATAT  
GGTGAGGGTGAGGATCAGGAAGAGATCCATTCCAGAGATGCAGGTTTGGAAAT  
TCCAACACATCTTTGTAAGAAGAACTGAAAAAACAAACATTGACATCCTTTGTTC  
TCGTGAGCTGACTGGGTATGTGTGTGACAGTAGGGGTTATAATGCTGCTTTAC  
CTTCTGAGTCTGATTTAGATTAAGAAAAAAGATATATGAAATGATTATAAATC  
CATAAAACAAAATGAAAAGAGATGACTTTAAAAAAGACTCCTGAATAAAATTA  
TTGGAGATTTTTTCATTTTATCATTTTTCTATTTTTCTGTTTGTTTTTTTGATGCTT  
AAACTGCTCTGTGTAAGAGAGGAAAAAACAGCTGTAGTCACTTTTTGACCAT  
GCGTGCAAGTGAATATAGAAAATATTTCACTTCTTTTTTACATCTATAGTTTGT  
GTTGATAAGCCAACCTGATATGTTTGTCTGTGTGTCTGTCCAGTTGTCCGTCCC  
CTCTTATCAGGAGGAATTTACAACCAACAAAACAGGAATTTCTTTTTTTTATATT  
TTGTTTTCTTTTTTATGAAATACAACCTTTGGAGAAAAAACAACACAAACAGG  
AAAAATAATGCAACAGAACTGAAAATACACACACACACACACACACACGTGC  
ACACATACAAACACAGACCACTTTTTGTGACTGGGTAAAGGAAGCTATTGAAG  
GATTCTCTCAGGTAAGAACAATTTCTAATAAATGATGATGAACCTTAGATGA  
AAAACCATTGTTAGCTCATCTTTTTTGTCTCAATTCTCAATTTACAATCAGCAAT

```

GTACCTTTTTTCTCCTCTGTGTTCCGGTCCTGGACAAGTGTCAGGATAAAAA
AGGTGTAGACATCCAGGTTTCAAACATTGGATCCTGAGTCTACTTCAACCAT
AAAGAATTATGCCCTCATTGCTTTCTTAACCCTGAGTGAAAACACATTTTCATGT
GTGGACGTGGGAGAGTGATGTGACTTTGAGTTGTATTTGTTTGGGTTTCAGTGC
TGC ACTGTGTTGAAGCCCATTCCCTCCAGGAAAAAGACAGAAATAAATGAAAA
TTTAGGAATGACCACAATAAATTGTTCTCATGGTAAATCGAAATAATTTTGATTT
GAAGTCACATTTTTGACTTTTTACAATCTCATGATTTTGATTTACTCTCTGAAAG
TGAATTCTATTATTATCATTTTGTGCTCTTAAAGCGTTGTCCTATTATCTCAAAA
GCATGACTTAGTGTGACATAATTTAGATTTTCAAAGTAAATTCTTTTACTTACA
GCCTCATTAGTTAAATTTTTTTTACCCCTAATTTTTATCTTTAATCCCATTG
GCAATGGGCTGCCATACCACAGTGAAAACACACAAGATTTAATTTATTTTTTTT
ACTCAGACAAGCTTATTTTTATTTT CAGAAGTCCAGCTTGAGCATTGATCCTAA
ATAAATCACATTTTGATGTTTCTCATGAACACGTGCCAGATTGTACAAAAGCAA
ATTCAGCCCTTACTGTCAGTGATAGCTTAAAGCTTTGCACTTTCCTCCTTTACGG
TCAAAGTGCCCGCAGCAATACCAGCTCTCCCTCACCCAGTTGGCTAATGGT
GAACATACAGCAGTACATGGCTCCCATTCAAGCCAGGCACCATCCACCCTCA
GGGGTGGGGGAGGGAAGGGCCAGAGGAACTGGCTTTGTTCTTCCATTCCA
GGCTGTTCTATTTCAAGTGTGCTTACTGTTTAACTTTGTGATGTACGGGAAGG
TTTGGCATGGCTAAAACCTGAGGCTGTGCATGGAACAACGGGTGACAAGTTAA
AGGAAAAACCTGAATGATTGAGTGGAGAAACATAACAAATGCAGATGCTTCT
GGTACAGTTAAGCAATCAACATCCCATCATGCTCTGTGGCAGGTATAAAAATA
CTGATCAGGC

```

**Tabla XIII.** Secuencia obtenida del transcriptoma para receptor de hormona tiroidea beta.

Gen	Nombre	Tamaño
Thr $\beta$	Receptor de hormona tiroidea beta	3639
<b>Secuencia</b>		
ACACACACACTTACACACACACACGCGCGCATAGCCCTCGCCTGATTTGCAC TAGCGCGGGTCATTTCAAGTTAAACCCTGGCGCTGTGTCCCGTCCAGTTTAG CCGACGGAGATCAACACTGGTGGTTCCAGCTGAGGAGGAATGCACAGACAC CGGGACTCCAAATAATTTTTTTTTTCCGGACACGAGCTTCTTCTTGCATATGCG GTGTTTCTCTCGGGGAGCTCAGCAGCTCCTCAGCGCTGCCTGGAGTCAGTTC ACCACTTCTCTGCTAGGTAGGTACCCAGATGTCTGAGGAGGCTCTGAGGAT GACATCTTGGCCTTGAACCCACAGTATGTCAGAGCCAGCAGAAAATGCT CCCCCGCTGGAAAGATGAGGCCATTCAAATGGGTACATACCGAGTTACCT AGACAAGGATGAGCTCTGCGTTGTGTGTGGGGACAAAGCCACCGGCTATCAC TATCGCTGCATCACCTGTGAGGGTTGCAAGGGTTTCTTCAGGCGGACGATCC AGAAGAATCTAAACCCGACCTACGCCTGCAAGTACGAGGGGAAATGTGTCAT		

CGACAAAGTGACCAGAAACCAGTGTGTCAGGAATGTCGCTTCAAGAAGTGCATT  
GCGGTGGGAATGGCGACCGACTTGGTGTCTGGACGACAGCAAGAGGCTGGCC  
AAGCGGAAGCTAATCGAGGAGAACCGGGAGCGCCGTCGGAGGGAGGAACTG  
CAGAGGACGGTGTGGGACCGACTGGAGCCCACCCAGGAGGAGTGGGACCT  
CATCCGTATGGTGACTGAGGCCCATATGGCCACGAATGCCCAGGGCAACCAC  
TGAAGCAGAAACGGAAATTCCTGAGTGCAGCGGGGGTGAAGGAACTAAG  
CCTGAGGATATTGGTCAAGCGTCCATGGCCAATGCACCGGAGGGAAGCAAAG  
TGGATATAGAAGCCTTCAGTCAGTTTACAAAAATTATCACCCCTGCCATAACC  
CGAGTGGTGGACTTTGCCAAAAAAGTGCCTATGTTTTGTGAGTTGCCTTGTGA  
AGACCAGATCATCCTGTTGAAAGGCTGCTGCATGGAGATCATGTCACTGCGC  
GCTGCCGTTTCGCTACGATCCGGAGAGCGAGACTCTCACGCTGAACGGCGAG  
ATGGCGGTACGCGGGGTGAGCTTAAGAACGGAGGCCTGGGCGTGTCTCG  
GACGCCATCTTCGACCTTGGCGTGTGCTGCTCCTCCTTTAACTTGGATGACTC  
CGAGGTAGCTCTACTACAGGCCGTATCCTGCTGTCATCCGATCGGCCTGGC  
CTGAGCAGCGTGGAGCGAATCGAACGCTGCCAAGAGGAGTTCCTGCTGGCC  
TTTGAACATTACATCAACTACCGCAAACACAAAGTGGCACATTTCTGGCCAA  
GCTGCTAATGAAGGTGACGGACTTGGCGATGATCGGTGCCTGCCACGCCAG  
CCGATTCTTCACATGAAAGTGGAGTGTCCACCGAGCTATTCCCTCCTCTCT  
TCCTGGAGGTCTTCGAGGACTGACCAATGGATTTTTAGTGTATGAGTACTGT  
GTGTGTGTGTGTGTGTTGAACAGTTTTCTGGCAAACGATGAACAGGCTTCAAT  
CTTTAATGCTACCTGCTGCATTCTGCCGAAAACTGTTCAGGACTAACTAAA  
AGCACACAATGACACTGATGTCAAGAAAAGACAATCAATACGACTCGTTTTCT  
TTTTCTTCTTTTTTGTGTTTAAACAATGCCACATGCTGTGCCAAAACCAAGTGAA  
TGATGCCCTCCTTACTGAATCCCTGCTGGGCTGTCATAGCGACACCAACACTC  
GGCTGGTTGTGCTAGTTAGCGCGCGCCTCTCGTGTTTCCAGTGCACGTTAGA  
GGCTCTGACTGTAGAACCGGTGCGAGTTTTAAGTGTTCATCTCAGCCATGTT  
GCCTCACTAGTCACACATAACAATGATTTCAACCGATTTGTTTTTCTGTTATTG  
CTCTTCTGTTTTTTTTTATTATTTTTTTTTATTATTTTATTACAACCTCCCTGCAAG  
CGGGAGACTTCATGTTAAAGCAGTGACGTCATGGTGCTACGGTGGGTGCGG  
GAAACGGCTGATTGAACTGTCTTACCTACATGCAGGAATGAACATGATCTCTG  
TTTGTATAACAGCCAACCCTCTTAGGATGGCATGCATATACTAACACA  
CAAACATGCACATATACAGTACATACAGTATACCTTCACACATAATGTACACAT  
GCACATATATATATATATATATATATATTCATCCATTCCCTTCAGTGGACCTGAGCAT  
GAGCAACTAACACTGTATGAACAAGAGGATTACTGTGACCAACTTCTCTCCCT  
TCTTCTGCTTGGGGATAAACAGTCTAGCATGTGACTTCCAGTTACATCTCA  
GTTATATCCAAAGTCTGTCTGTGCAGCCAGCCCCGGGGTTTCTCATAGTCAAC  
AGCATGAACTCATTTCCCTCACTGTGTGCAACTCAGAAGTAAAATTAAGTTT  
TAAAGATAAACCTACAAAAGTCTGACTTCCAAGCATTACAGCAGTGTTTCATTAG  
TCATGGCATTTCATATACAAATGATTCATAAAAGCAATGGACTGTTAGCTCGCT  
ATGAAAACCTCAACCTAAAATGATTTACAGTAACCTCAAAGTTGCATTATCAGT  
TTTACTCCACAACAAGCTGAAAATCTCTCATGTTTAGCAAACCTACCTACAACCC  
AAGCAGACGTGGAGCTTTGTGTGTCCGGTGACCTGATGAATGTAAGTCTGAC  
ACGGACTCTCCTTCAGTCTCTGTCGTGATCTTTAACAGCCTCTGAGAGAAATA  
CAGTATCTGGCACTTTAGCTGCTACTGAAGCCCTCCGTTATCTTTACTAGCTT

```
GTCGCTAACTTTGTCTGCTGTGTGTTGCTGGGCAGGTGGTGCAGCGTTGATT
TATCTGAGCGTTTCTGACTGTTTAATTGATGAGAGCACCAAGACGGATTGAAA
ACAGAACAGATGTGGGCCACATAAAACCAAACAGTTAGCTTAAAGACGCTAA
AATGCTCCATAAAGTTGTTGATAACTGAGTCATGATAATTCCTGTGGGGTCA
TCACTGTGAGCGACCCCCTGTCACATTACAGGTAGTCATTTGACTCATCGAAC
ACATAAAAACAATAATTAGTGCAGCTTTAACTCAAATCAAATAGAAATTTGAG
TTAGCATTACGAACCTTGACTTTCTGCCGTCGACGTGTCTGATGCTCATGTGT
GTGTTTTAACTGGAGTGAATGGGCCCCAGGAAACTGTTTCAAATTTCTACGT
CACAAACATTTAACCATAATTAATTGAATTTTCATATTTACAGAGCTGTTGGTG
CATGTAAACATAGTCAATGCTGACTGCTGGTTCAGAAGATGTTTACTGTTTCTG
AAGAGGTGCCAGTAACGCTGTTATCTCTCCCACGAATTGTTACATAATGTTAC
TCAGTTATAAACCAATAACGAGTTGCACCATAGAAAAGCTATTTTACAGTACAA
AGGAAAAAGGATGTATATTTTCAGACTGCAGATTTTTTTTTTTTACGGATGTTGT
TAGCATAATATGAACATACTGTTTTGCATAGTGTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAG
GA
```