

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSGRADO Y EDUCACIÓN CONTINUA
DOCTORADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR



Análisis de la expresión génica de hormonas reguladoras de apetito, leptina y grelina en corvina (*Cilus gilberti*, Abbott, 1899) en respuesta al estrés por densidad de siembra e hipoxia

Por:

Juan Francisco Alvarado Panameño

Requisito para optar al título de:

DOCTOR EN BIOLOGÍA MOLECULAR

San Salvador, mayo de 2025

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSGRADO Y EDUCACIÓN CONTINUA
DOCTORADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR



Análisis de la expresión génica de las hormonas reguladoras de apetito, leptina y grelina en corvina (*Cilus gilberti*, Abbott, 1899) en respuesta al estrés por densidad de siembra e hipoxia

Por:

Juan Francisco Alvarado Panameño

Requisito para optar al título de:

DOCTOR EN BIOLOGÍA MOLECULAR

Asesores: Dr. Claudio Álvarez, PhD
Dra. Claudia Cárcamo, PhD.

San Salvador, mayo de 2025

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

Rector:

M.Sc. Juan Rosa Quintanilla Quintanilla

Secretario general:

Lic. Pedro Rosalío Escobar Castaneda

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS

Decano:

Ing. MAECE Nelson Bernabé Granados Alvarado

SECRETARIO:

Ing. M.Sc. Edgar Geovany Reyes Melara

DIRECTOR DE LA ESCUELA DE POSGRADO Y EDUCACIÓN CONTINUA:

Dr. Abel Alexei Argueta Platero

COMITÉ ACADÉMICO DE LA ESCUELA DE POSGRADO Y EDUCACIÓN CONTINUA

M.Sc. Modesto Antonio Juárez

Dra. Marcia Lizeth Barrera de Calderón

Dra. Yockling Elizabeth Lima

Dr. Joaquín Miguel Castro Montoya

RESUMEN

En la búsqueda de marcadores moleculares reguladores de apetito para corvina *Cilus gilberti* bajo condiciones de cultivo, se estudió la expresión génica de las hormonas grelina y leptina. **La grelina**, un péptido gastrointestinal, que desempeña un papel estimulante en la ingesta de alimentos en mamíferos y peces teleósteos. **La leptina**, hormona que se encuentra tanto en mamíferos como en peces, y desempeña un papel fundamental en la regulación de diferentes procesos fisiológicos, como el apetito, el metabolismo lipídico, el crecimiento, la reproducción, el estrés y la respuesta inmunitaria. El estudio tuvo como objetivo investigar la expresión y la capacidad orexigénica de la grelina acilada (cgGhre) y no acilada (D-cgGhre) en juveniles de *C. gilberti*, analizando la expresión de ARNm en estómago. Además, se obtuvo secuencias codificantes de esta hormona, para luego identificar el péptido maduro. Los resultados mostraron que el estómago tuvo mayor expresión de ARNm de la hormona, con mayores niveles expresión en período preprandial, disminuyendo al final del período. También, se obtuvo la expresión de ARNm del receptor de grelina (GHS-R), en los órganos gastrointestinales, lo que apunta a una regulación orexigénica periférica en estos tejidos; cuyos resultados sugieren que la grelina de *C. gilberti* conserva la capacidad orexigénica descrita en otros peces teleósteos, con una función reguladora en el en el tracto gastrointestinal (TGI) y sistema nervioso central. De igual manera se investigó la **leptina** en *C. gilberti* (cgLep), evaluando su expresión génica bajo diferentes condiciones de cultivo y alimentación. Los resultados indicaron que la secuencia de codificación de cgLep produce una prohormona de 137 aminoácidos, conservando residuos de cisteína relevantes en la integridad estructural. Los perfiles basales de expresión génica de esta hormona revelaron que dieron principalmente en el hígado, seguido del músculo blanco. Por el contrario, su receptor (cgLepR) mostraron niveles más altos en el músculo blanco. Además, se observó que *C. gilberti* en estado posprandial mostraron una regulación al alza de la cgLep hepática. Simultáneamente, el cgLepR mostró un aumento significativo a nivel cerebral durante la fase preprandial. La exposición a la hipoxia aguda reveló una notable regulación al alza de cgLep después de dos horas de esa esa condición, volviendo a su línea de base de normoxia después de seis horas de hipoxia. Finalmente, los peces estudiados cultivados a 15 Kg/m³ mostraron una variabilidad individual significativa en niveles de expresión hepática de leptina, en comparación con los cultivados a 25 o 35 kg/m³, lo que sugiere que la leptina se expresa principalmente en el

hígado, influenciada por los periodos de ayuno y estrés crónico, inducido por la baja densidad poblacional, lo que podría influir en la ingesta de alimento, destacando la importancia de considerar estos factores en el diseño e implementación de prácticas de acuicultura para *C.gilberti*.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS en todas las percepciones aceptadas universalmente, por ser parte integral del día a día.

Agradecimiento especial a la Dra. Katherina Brokordt, jefa del Laboratorio de Fisiología y Genética Marina - FIGEMA, Universidad Católica del Norte, quien me facilitó el acceso al Laboratorio en todas las estancias realizadas.

A todos(as) mis amigos(as) que forman o formaron parte del (FIGEMA)- Universidad Católica del Norte, especialmente a: Ana Mercado, Belinda Vega, Elisa Torres, Carla Trigo, Johana Defranchi, Katy Jenó, Willian Farías y Roxana González ... quienes desinteresadamente fueron de gran apoyo académico y emocional en mis estancias.

Al Centro Acuícola Tongoy - Fundación Chile (FCh), por permitir la donación del material biológico y sus instalaciones para realizar parte del muestreo de tejidos de *C. gilberti*.

Al Laboratorio de Piscicultura de la Facultad de Ciencias del Mar, por facilitar sus instalaciones y equipos para el montaje y desarrollo de los bioensayos.

A la Facultad de Ciencias Agronómicas - Universidad de El Salvador, por apoyarme en lo requerido para viajar a la República de Chile y realizar la investigación relativa a la tesis doctoral. De igual manera al Ministerio de Educación Ciencia y Tecnología (MINEDUCYT) por el apoyo económico parcial en el desarrollo de este proyecto.

Al M.Sc. Mario Orellana Núñez, Coordinador de la Escuela de Posgrado y Educación Continua, por su esfuerzo en la gestión del programa de Biología Molecular en la Facultad de Ciencias Agronómicas-UES, y guiar los primeros pasos para todos los doctorandos.

Especial agradecimiento a mis asesores Dr. Claudio Álvarez y Dra. Claudia Cárcamo, por haber confiado en mí en este reto académico, brindándome sus innumerables e invaluable aportes en el desarrollo de la investigación. ¡¡ Muchas gracias por su amistad y su empeño profesional!!

DEDICATORIA

A mi familia en general, y en especial a mis hijos, a quienes quise demostrar que “la vida es la suma de esfuerzos y desafíos a vencer ... para obtener frutos”

ÍNDICE GENERAL		Pag.
1.	INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1	Importancia de la expresión génica en acuicultura	3
1.2	Regulación de la expresión génica	5
1.3	Regulación neuroendocrina de la alimentación en peces	7
1.3.1	<i>Neuropéptidos orexigénicos</i>	7
1.3.1.1	<i>Neuropéptidos Y (NPY)</i>	7
1.3.1.2	<i>Orexinas (OX)</i>	7
1.1.1.3	<i>Galaninas (GAL)</i>	8
1.3.2.	<i>Neuropéptidos anorexigénicos</i>	9
1.3.2.1	<i>Hormona liberadora de corticotropina (CRH)</i>	9
1.3.2.2	<i>Transcrito relacionado con cocaína y anfetaminas (CART)</i>	10
1.4	Respuesta de los peces al estrés	11
1.5	Estrés inducido por hipoxia	14
1.6	Estrés inducido por densidad de cultivo	15
2.	OBJETIVOS	17
2.1	General	17
2.2	Específicos	17
3.	HIPÓTESIS	17
4.	CAPÍTULO I: CARACTERIZACIÓN Y PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LEPTINA DE <i>Cilus giberti</i> EN RESPUESTA A HIPOXIA Y DENSIDAD DE CULTIVO.....	18
4.1	Resumen	19
4.2	Introducción	20
4.3	Leptina y su receptor	20
4.4	Expresión de leptina en peces	24
5.	MATERIALES Y METODOS	25
5.1	Recepción y mantenimiento de peces	25
5.2	Bioensayo de hipoxia aguda	25
5.3	Bioensayo de hipoxia intermitente	26
5.4	Bioensayo pre y postprandial	27

5.5	Bioensayo de densidad de cultivo	28
5.6	Extracción de ARN y obtención de secuencias codificantes para leptina, y receptor de leptina de <i>C. gilberti</i>	30
5.7	Análisis bioinformático	30
5.8	Expresión génica por RT-qPCR	31
5.9	Análisis estadístico	31
6.	RESULTADOS	32
6.1	Caracterización y análisis comparativo de secuencias codificantes de leptina de <i>C. gilberti</i>	32
6.2	Expresión basal de leptina y su receptor en tejidos de juveniles de <i>C. gilberti</i>	34
6.3	Efecto del estado de alimentación sobre la expresión génica de leptina y su receptor en juveniles de <i>C. gilberti</i>	36
6.4	Efecto de la hipoxia aguda e intermitente sobre la expresión génica de leptina en juveniles de <i>C. gilberti</i>	37
6.5	Efecto de la densidad de cultivo sobre la expresión génica de leptina en juveniles de <i>C. gilberti</i>	38
7.	DISCUSIÓN	39
7.1	Caracterización de la secuencia codificante de leptina de <i>C. gilberti</i>	39
7.2	Expresión basal de leptina y su receptor en tejidos de juveniles de <i>C. gilberti</i>	41
7.3	Efecto del estado de alimentación en la expresión de leptina y su receptor en juveniles de <i>C. gilberti</i>	43
7.4	Efecto de la hipoxia aguda e intermitente sobre la expresión génica de leptina en juveniles de <i>C. gilberti</i>	44
7.5	Efecto de la densidad de cultivo sobre la expresión génica de leptina en juveniles de <i>C. gilberti</i>	45
8.	CONCLUSIONES	46
9.	REFERENCIAS	46
10.	CAPITULO II: CARACTERIZACIÓN Y PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA DE GRELINA DE <i>Cilus gilberti</i> EN RESPUESTA A HIPOXIA Y PERIODOS DE ALIMENTACIÓN	51
10.1	Resumen	52

10.2	Introducción	52
10.3	Grelina y su receptor	54
10.4	Expresión génica de grelina en peces	55
10.5	Efecto del estrés sobre grelina en peces	56
11.	MATERIALES Y METODOS	57
11.1	Recepción y mantenimiento de peces	57
11.2	Bioensayo de hipoxia crónica	58
11.3	Bioensayo pre y posprandial	58
11.4	Extracción de ARN y obtención de secuencias codificantes para grelina, receptor de <i>C. gilberti</i>	59
11.5	Alineamientos múltiples de secuencias de aminoácidos de <i>C. gilberti</i> con teleósteos homólogos, y filogenia de grelina	60
11.6	Análisis bioinformático	60
11.7	Expresión génica de grelina mediante RT-qPCR	61
11.8	Análisis estadístico	61
12.	RESULTADOS	62
12.1	Alineamientos múltiples de secuencias de aminoácidos de grelina de <i>C. gilberti</i> con teleósteos homólogos	62
12.2	Expresión basal de ARNm de grelina en diferentes tejidos de <i>C. gilberti</i>	63
12.3	Expresión basal de ARNm del receptor de grelina (GHS-R) en diferentes tejidos de <i>C. gilberti</i>	64
12.4	Expresión relativa de ARNm de grelina en estómago de <i>C. gilberti</i> , por periodos de alimentación pre y posprandial	65
12.5	Expresión de ARNm de grelina y su receptor (GHS-R) de <i>C. gilberti</i> sometidos a hipoxia crónica	66
13.	DISCUSIÓN	67
13.1	Caracterización y análisis comparativo de secuencias codificantes de grelina de <i>C. gilberti</i> con teleósteos homólogos	67
13.2	Expresión basal de ARNm de grelina y su receptor grelina (GHS-R) en diferentes tejidos de <i>C. gilberti</i>	68

13.3	Expresión de ARNm de grelina en estómago de <i>C. gilberti</i>, y efectos en periodos de alimentación	69
13.4	Efectos de la hipoxia crónica sobre la expresión de ARNm de grelina en estómago de <i>C. gilberti</i>	70
14.	CONCLUSIONES	71
15.	REFERENCIAS	72
16.	DISCUSIÓN GENERAL	77
16.1	Caracterización de leptina y grelina de <i>C. gilberti</i>	78
16.2	Expresión basal de ARNm de leptina y grelina de <i>C. gilberti</i>	79
16.3	Expresión basal de ARNm del receptor de leptina (LepR) y del receptor de grelina (GHS-R) en tejidos de <i>C. gilberti</i>	81
16.4	Expresión de leptina (hígado) y grelina (estómago) a nivel pre y posprandial de <i>C. gilberti</i>	83
16.5	Propiedades anorexigénicas de leptina y orexigénicas de grelina de <i>C. gilberti</i>	84
17.	CONCLUSIONES	87
18.	REFERENCIAS	88

INDICE DE FIGURAS		Pag.
Figura 1.	Distribución geográfica de <i>Cilus gilberti</i> [Extraído de Oyarzún et al., (2001)..	2
Figura 2.	Modulación de la alimentación mediante neuropéptidos	12
Figura 3.	Estructura terciaria de leptina humana (A), leptina-a (B) y leptina-b (C) del pez cebra (<i>Danio rerio</i>).....	21
Figura 4.	Bioensayo: Hipoxia aguda en corvina <i>C. gilberti</i>	26
Figura 5.	Bioensayo: Hipoxia intermitente en corvina <i>C. gilberti</i>	27
Figura 6.	Bioensayo: Pre y Postprandial en corvina <i>C. gilberti</i>	28
Figura 7.	Bioensayo: Densidad de cultivo en corvina <i>C. gilberti</i>	29
Figura 8.	Modelización en silico de leptina de <i>C. gilberti</i>	32
Figura 9.	Alineamientos múltiples de secuencias de aminoácidos de leptina putativa de <i>C. gilberti</i> con especies homólogas de teleósteos	33
Figura 10.	Árbol filogenético de la secuencia de aminoácidos de leptina	34
Figura 11.	Expresión relativa de ARNm de leptina en tejidos de <i>C. gilberti</i>	35
Figura 12.	Expresión relativa de ARNm del receptor de leptina en tejidos de <i>C. gilberti</i> ...	35
Figura 13.	Expresión relativa de ARNm de leptina en hígado de <i>C. gilberti</i> en períodos preprandial y posprandial.....	36
Figura 14.	Expresión relativa de ARNm del receptor de leptina (LepR) en cerebro y estómago de <i>C. gilberti</i> en períodos preprandial y posprandial.....	37
Figura 15.	Expresión relativa de ARNm de leptina en hígado de <i>C. gilberti</i> , en normoxia (7,6 mg O ₂ /L) y después de 2 h y 6 h de hipoxia aguda (2 mg O ₂ /L)	38
Figura 16.	Expresión relativa de ARNm de leptina en hígado de <i>C. gilberti</i> , mantenidos en normoxia o hipoxia intermitente diaria	38
Figura 17.	Expresión relativa de ARNm de leptina en hígado de <i>C. gilberti</i> a 15, 25 y 35 Kg/m ³ densidades de cultivo	39
Figura 18.	Alineamientos múltiples de secuencias de aminoácidos de grelina en especies de teleósteos	62
Figura 19.	Árbol filogenético de secuencias de aminoácidos de grelina	63
Figura 20.	Expresión basal de ARNm de grelina en diferentes tejidos de <i>C. gilberti</i>	64
Figura 21.	Expresión basal de ARNm de GHS-R en diferentes tejidos de <i>C. gilberti</i>	65

Figura 22.	Expresión relativa de ARNm de grelina en estómago de <i>C. gilberti</i> en períodos preprandial y posprandial	66
Figura 23.	Expresión relativa de ARNm de grelina en estómago de <i>C. gilberti</i> sometidos a hipoxia crónica	66

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATG	Codón de inicio
ACTH	Hormona adrenocorticotropa o adrenocorticotropina
CCK	Colecistoquinina
CART	Transcrito relacionado con cocaína y anfetaminas
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
GAL	Galanina
HIF	Factor inducible por hipoxia
NPY	Neuropéptido Y
ORF	Marco abierto de lectura
OX	Orexina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT-qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa y Cuantificación en Tiempo Real
UA	Unidades arbitrarias

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El crecimiento de la población humana en el planeta está generando incremento de la demanda de plantas y animales acuáticos para el consumo y otros usos, aumentando los niveles de presión de la pesca de captura, llegando a sus límites en los últimos años; lo que ha generado que la acuicultura sea el sector alimentario de más rápido crecimiento en el mundo, con la mayor diversidad de especies cultivadas, favoreciendo la seguridad económica, social y ecológica (FAO, 2017), razón por la cual, diferentes países están impulsando el desarrollo de la acuicultura de peces, con el objetivo de introducir al mercado nuevas especies para el consumo humano.

Los peces pertenecientes a la familia Sciaenidae, incluye alrededor de 70 géneros y 270 especies, y se encuentran distribuidas en regiones templadas y tropicales del mundo. Estos animales, se consideran especies euritermas y eurihalinas, es decir, que pueden tolerar altas gamas de temperatura (2 a 38°C), así mismo, pueden tolerar alta gama de salinidad en su entorno (5 a 39%), permitiéndoles ingresar a desembocaduras de ríos y lagunas en estuarios (Cardenas et al., 2011). También, debido a la calidad de su carne, varias especies de la familia Sciaenidae se cultivan a nivel comercial y/o han iniciado su producción experimental. En China, se cultiva la corvina amarilla (*Larimichthys crocea*), especie con mayor producción a nivel mundial (Hong y Zhang, 2003). A una menor escala se encuentra la *Argyrosomus japonicus* en Australia, Sudáfrica y Taiwan; *Argyrosomus japonicus regius* en España, Egipto, Francia, Italia, Marruecos y Turquía, *Micropogonias funieri* en Uruguay; *Sciaena umbra* en Grecia y Turquía; *Sciaenops ocellatus* en EE. UU, China, Ecuador, Israel, Martinica, México y Taiwan; *Umbrina cirrosa* en Chipre, España, Grecia, Italia y Turquía (Cárdenas, 2011). Así, los esciénidos se convierten en una familia de peces atractiva para diversificar la acuicultura de peces en el mundo.

En aguas marinas de América, existen diferentes especies de peces pertenecientes a la familia de los esciénidos y que son valorados por la calidad de su carne. Es posibles encontrar a la corvina pinta (*Cynoscion nebulosus*), corvinata real (*Cynoscion regalis*) en EE.UU. y México; corvina golfina (*Cynoscion othonoptreus*) en México; corvina boquinaranja (*Cynoscion xanthulus*) en EE.UU.; corvinón amarillo (*Micropogonias funieri*) en Uruguay (Cárdenas, 2012). En El Salvador, según un estudio realizado en 2007 en la zona oriental del país (Golfo de Fonseca), registraron mayor abundancia de los esciénidos *Cynoscion phoxocephalus*, *Cynoscion squamipinnis* y *Isopisthus remifer* (Chicas, et al., 2012), por lo cual, peces de esta familia se vuelven potencialmente estratégicas para impulsar la acuicultura en países tropicales.

En el pacífico de **Chile**, se encuentra reportada la corvina *Cilus gilberti*, (Abbott, 1899), conocida coloquialmente como corvina chilena, corvina pampera o corvina tambor; endémico de Chile, con una distribución desde la región de Chiloé por el sur, hasta la zona norte del Perú, incluyendo el Islas Galápagos (Figura.1), con un rango de profundidad que va desde 1 a 50 metros, y puede encontrarse en fondos arenosos y rocosos costeros (Béarez, 1995). Es una especie carnívora depredadora y se alimenta de peces y crustáceos; (Fernández y Oyarzún, 2001), pudiendo alcanzar alrededor de 120 cm de longitud total (Béarez, 1995), aunque el tamaño promedio de pesca ronda los 50 cm de longitud total (Mann 1954), logrando el principio de su madurez a un tamaño medio de 54,8 cm de longitud total (Oyarzún et al. 1999), entre 3 y 6 años de edad.

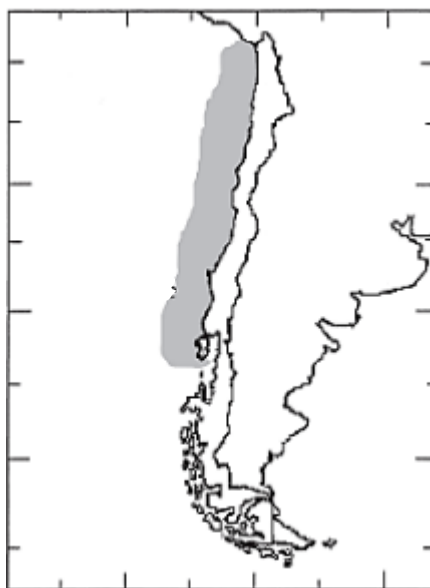


Figura 1. Distribución geográfica de *Cilus gilberti*. Extraído de Oyarzún et al., (2001).

Debido a su calidad nutricional, este pez ha sido incluido como una de las especies de los programas de diversificación acuícola en Chile. Fundación Chile (FCh), con el apoyo de la Cooperación de Fomento de la Producción (CORFO), desde el año 2011 trabajo con tecnologías encaminadas al cultivo de dicho esciéndido, logrando cerrar su ciclo productivo, desde la reproducción, fase larvaria y finalizando en el engorde, lo que apunta a mejorar el rendimiento productivo. Al respecto, uno de los parámetros importantes a considerar en este proceso, es la densidad de cultivo, la cual si no se evalúa apropiadamente podría inducir estrés crónico en los individuos, provocando consecuencias negativas en su crecimiento. El efecto de la densidad de cultivo puede activar las rutas del estrés y reguladores de apetito, afectando las señales endocrinas

periféricas del control de la ingesta (Sun et al., 2017), siendo esto determinante en la acuicultura, ya que varias especies pueden tener un comportamiento agresivo que resulta en la presencia de individuos dominantes y subordinados, los cuales pueden presentar importantes diferencias del comportamiento alimentario entre ellos (Rønnestad et al., 2017), además, los peces mantenidos en condiciones ideales se desarrollan eficientemente, responden mejor a patógenos y factores estresantes, mostrando tasas de crecimiento superiores (Bernier y Peter, 2001). Por otra parte señalar que los sitios elegidos para la etapa de engorde de esta especie, enfrentan frecuentes periodos de hipoxia, por lo tanto, es otra variable que debe tenerse en cuenta, para mejorar su rendimiento productivo en jaulas marinas (Álvarez et al., 2020). Tanto la densidad de cultivo como la hipoxia pueden gatillar efectos perjudiciales en la ingesta de alimentos, provocando pérdidas económicas a los productores, y por otro lado, el alimento no consumido se deposita en el fondo marino, afectando los ecosistemas donde se cultivan estos organismos.

Considerando que la ingesta adecuada de alimentos, la absorción de nutrientes, y posteriormente convertida en energía, se convierte es el combustible necesario para la sobrevivencia de todos los animales, vital para el crecimiento, respuesta inmunológica y reproducción. Sin embargo, los requerimientos nutricionales varían según el ciclo de vida, el estado fisiológico y reproductivo de los animales, la alimentación es un comportamiento complejo, que está regulado por señales neuroendocrinas centrales y periféricas.

En este contexto, la presente investigación aborda el estudio de dos hormonas que cumplen roles antagónicos en la regulación de la ingesta de alimentos en animales, incluidos los peces. Por una parte, se estudió a Grelina, un neuropéptido expresado principalmente en el estómago de peces, y que se le atribuye un rol orexigénico, en diferentes especies de peces, es decir, inductor del apetito. Mientras que la hormona leptina, es una proteína con diferentes funciones fisiológicas actuaría como un inductor de saciedad. De esta manera, se vuelve necesario comprender los mecanismos detrás de la ingesta de alimentos en peces, para identificar aquellas moléculas que cumplen un rol clave en regular dicho proceso.

1.1 Importancia de la expresión génica en acuicultura

Alcanzar el tamaño comercial de los peces cultivados se vuelve un importante desafío en esta industria, ya que respuestas fisiológicas están asociadas a estos parámetros productivos, que para el caso, están reguladas por el efecto de la hormona de crecimiento (GH) y el factor de crecimiento

similar a insulina (IGF) (Vélez et al., 2017); en este sentido, las granjas acuícolas utilizan crías selectivas como herramienta para mejorar la eficiencia biológica de la producción, con una tasa de crecimiento de ganancia genética del 12,5% promedio por generación, con la finalidad de aumentar la conversión alimenticia y supervivencia, logrando mayor eficiencia en el uso de los recursos alimenticios, mano de obra, agua, así como áreas terrestres y marinas disponibles (Gjedrem et al., 2012).

Por lo tanto, la supervivencia y capacidad de adaptación de un organismo al entorno cambiante, está relacionada con la variación genética, y conduce a la diferenciación que pueda existir a nivel de población, donde el desarrollo de marcadores moleculares pueden jugar un papel importante, en capacidad para identificación especies, variación genética y poblacional, además la comparación entre poblaciones silvestres y de criadero (Chauhan y Rajiv, 2010).

La comprensión de la epigenética en peces de agua dulce como marinos, son áreas en la acuicultura, como la manipulación ambiental, cuya intención es inducir una "memoria epigenética" ya sea dentro o entre generaciones, para producir un fenotipo deseado. En segundo lugar, podría ser la selección epigenética, que, sola o combinada con la selección genética, puede aumentar la confiabilidad de producir animales con los fenotipos deseados, mediante mecanismos epigenéticos, incluida la metilación del ADN, modificaciones de histonas y ARN no codificante (Gavery y Roberts, 2017)

Allen et al., (2021), en un estudio con cojinoba (*Seriolella violacea*), especies de interés comercial en América del Sur, al medir variables como el metabolismo, la capacidad y eficiencia de natación, proporciones de músculo rojo y blanco, así como parámetros bioquímicos (aeróbicos y anaeróbicos) asociados con la glucosa, lactato plasmático y actividades de las enzimas musculares; se concluyó que esta especie, tiene una tasa metabólica moderada en comparación con otras especies pelágicas, muestra comportamiento de cardumen, es maniobrable a bajas velocidades debido al uso de aletas pectorales, pero tiene eficiencias de natación óptimas a velocidades más altas, lo que sugiere que son factores beneficiosos para para el crecimiento y el bienestar de la especie.

1.2 Regulación de la expresión génica

La regulación de la expresión génica, podría explicarse como el proceso ordenado de las macromoléculas involucradas en la transmisión de la información genética a nivel de la síntesis de ácido ribonucleico (ARN) a partir de ADN (transcripción), asociadas a la actividad y morfología de la célula, contribuyendo con el organismo a responder a su entorno, la cual se lleva a cabo por una variedad de mecanismos, entre ellos la modificación química de los genes y la activación o desactivación de los mismos, mediante su asociación con proteínas reguladoras. Entre estos mecanismos tenemos la metilación del ADN, las modificaciones postraduccionales de las histonas, el silenciamiento génico mediado por ARN no codificantes (Cavagnari, 2012); sin embargo, no todos los factores de transcripción son sensibles a la metilación del ADN que ocurre dentro de sus sitios de unión, ya que se han descrito de manera alternativa proteínas de unión a metil-CpG que se unen al ADN metilado, produciendo una estructura de cromatina represiva (Bommarito y Fry, 2018). Todo esto es de suma importancia para que un organismo sobreviva y pueda desarrollarse en la naturaleza, este debe responder y adaptarse a los cambios ambientales, y lo hace detectando señales externas y traduciéndolas en comportamientos a través de cambios en la actividad sináptica (Bhat et al., 2021). Aquí radica la importancia que tiene el hipotálamo que integra aportes provenientes de factores que estimulan (orexigénicos) e inhiben (anorexigénicos) el consumo de los alimentos (Volkoff et al., 2005).

Las nuevas tecnologías que analizan las transcripciones de ARN presentan nuevos conceptos y oportunidades en apoyo de la producción pesquera sostenible, donde las herramientas genómicas han aumentado rápidamente en la investigación acuícola, donde se abordan aspectos de la salud de los peces, la toxicología y los efectos de genes funcionales implicados en el crecimiento, la maduración y el desarrollo de la vida. A nivel genómico se están abordando: genómica evolutiva y biodiversidad, respuestas fisiológicas adaptativas en entornos cambiantes, y genómica conductual adaptativa (Nielsen y Pavey, 2010).

La conversión del código genético en proteínas funcionales, conocidas como expresión génica, es crucial para determinar los rasgos de un organismo, donde la regulación génica controla el momento y la cantidad de genes involucrados. En acuicultura es de suma importancia comprender estos mecanismos genéticos, para identificar rasgos fisiológicos relevantes en la producción, así como para elegir poblaciones reproductoras adecuadas y/o facilitar su adaptación (Sharma et al., 2024). En estudios realizados con peces ciprínidos rohu (*Leabeo rohita*) se pudo

demostrar el rol orexigénico de la grelina y anorexigénico de la leptina, durante periodos de ayuno y sobrealimentación, mantuvieron la homeostasis energética mediante la regulación del metabolismo de los nutrientes (Dar et al., 2018).

En la actualidad, se cuenta con nuevas tecnologías que permiten la cuantificación precisa de los amplicones mediante RT-PCR, usando marcadores fluorescentes, como el SYBR Green I, que mediante su unión a ácidos nucleicos de doble cadena valora la cantidad de DNA presente en cada ciclo de amplificación (Bonilla et al., 2002).

1.3 Regulación neuroendocrina de la alimentación en peces

La ingesta adecuada de alimentos (nutrientes) es el combustible necesario para la sobrevivencia de todos los animales, posteriormente, estos nutrientes se convierten en energía para el crecimiento, respuesta inmunológica y reproducción. Sin embargo, los requerimientos nutricionales varían según el ciclo de vida, el estado fisiológico y reproductivo de los animales, es decir, la alimentación es un comportamiento complejo, que está regulado por señales neuroendocrinas centrales y periféricas. De esta manera, la ingesta de alimentos está modulada por reguladores que se encuentran tanto en el cerebro como en tejidos periféricos (Volkoff, 2016). Es decir que la regulación del apetito es un mecanismo fisiológico controlado por una amplia variedad de neuroseñales (Matsuda et al., 2011). Estas señales pueden ser endocrinas, actuando como neuropéptidos de pequeño tamaño o proteínas, los cuales pueden inducir el consumo de alimentos, denominándose orexigénicos, mientras las que lo inhiben son denominadas anorexigénicos (Conde-Sieira et al., 2018).

En peces como en mamíferos, los sistemas neuronales orexígenos y anorexígenos están morfológica y funcionalmente conectados, formando una red interconectada en el hipotálamo para controlar la ingesta de alimentos (Volkoff, 2016; Rønnestad et al., 2017). Además, muchas moléculas identificadas en vertebrados superiores han sido descritas también en peces teleósteos.

Es el caso de los neuropéptidos orexigénicos NPY (neuropéptido Y), orexina, galanina y β -endorfina; todos ellos sintetizados principalmente en tejido hipotalámico. Mientras que grelina, pareciera ser la principal hormona periférica que se expresa en el estómago en diferentes peces teleósteos. También se han descrito neuropéptidos anorexigénicos como el transcrito relacionado con cocaína y anfetaminas (CART), el cual es se considera un potente péptido anorexigénico en mamíferos (Letters to Nature, 2001) y en aves (Tachibana et al., 2003). Se considera que es un neurotransmisor y hormona clave en la regulación de diversos procesos biológicos, como la ingesta

de alimentos, el mantenimiento del peso corporal, sumado a la respuesta al estrés, efectos psicoestimulantes y funciones endocrinas (Lau y Herzog, 2014).

1.3.1 Neuropéptidos orexigénicos

1.3.1.1 Neuropéptidos Y (NPY)

La familia de neuropéptido Y, está formada por el neuropéptido Y (NPY), que se expresa en los sistemas nerviosos central y periférico, mientras que los péptidos YY (PYY), el polipéptido pancreático (PP), son péptidos endocrinos intestinales. Los tres péptidos tienen 36 aminoácidos y actúan sobre receptores acoplados a proteínas G. El NPY y el PYY están presentes en todos los vertebrados, mientras que el PP probablemente ha surgido como una copia del PYY en un antepasado tetrápodo primitivo. En los peces óseos y cartilagosos, NPY y PYY tienen sólo 5-6 diferencias, con una localización neuronal más extensa de PYY, lo que indica un solapamiento funcional entre ambos péptidos (Larhammar, 1996).

El sistema NPY en vertebrados, es uno de los neuropéptidos más abundantes del cerebro, y participa principalmente en la regulación de la ingesta de alimentos, también está relacionado con el proceso de envejecimiento, con efectos positivos en la supervivencia neuronal mediante la modulación de la autofagia. En peces longevos (*Nothobranchius furzeri* y *Danio rerio*) el NPY está relacionado con la edad en cerebro e intestino anterior, respectivamente. En ambas especies de peces sólo se ha identificado Npya, mientras que en los demás teleósteos se han identificado dos clases de NPY (Npya y Npyb) (Giaquinto et al., 2022).

El NPY en peces también es un potente factor orexigénico, comprobado mediante un estudio con pez dorado (*Carassius auratus*), al que se administró una inyección intacerebroventricular de NPY (gNPY), provocando un efecto dependiente de la dosis, y aumentando la ingesta de alimentos (Narnaware et al., 2000)

1.3.1.2 Orexinas (OX)

Las orexinas también conocidas como hipocretinas, son neuropéptidos segregados por el hipotálamo, la cual se divide en orexina-A (OXA) y orexina-B (OXB), que derivan de un precursor común secretado por las neuronas hipotalámicas. Estas actúan sobre el receptor (OX1R) y el receptor de orexina-2 (OX2R). Tanto las neuronas de orexina, así como los receptores, están

ampliamente distribuidos en diversas regiones del cerebro, así como en el sistema periférico, y tienen una amplia diversidad de funciones fisiológicas (Xia et al., 2023).

Estos neuropéptidos hipotalámicos se identificaron inicialmente en el cerebro de ratas como ligandos endógenos de un receptor acoplado a proteína G; los cuales intervienen en muchas funciones fisiológicas, entre ellas la regulación del comportamiento alimentario, la vigilia y las funciones autonómicas/neuroendocrinas y los estados de sueño/vigilia en mamíferos (Soya y Sakurai, 2020).

Las orexinas actúan como factor orexigénico para la regulación del apetito y la ritmicidad en mamíferos, sin embargo, en peces de colores, cuando se le administró orexina A intracerebroventricular (ICV), afectando la ingesta de alimentos, y también a la actividad locomotora (Nakamachi et al., 2014). Además, también se ha descubierto que participa en la regulación de una serie de funciones, tales como como el sexo, las interacciones sociales y sobre todo, los comportamientos relacionados con la recompensa (Haghparast et al., 2017); también se ha descrito que en peces, intervienen en la homeostasis energética, para el caso, la orexina-A participa en el metabolismo de la glucosa (Yang et al., 2020).

1.3.1.3 Galaninas (GAL)

Los péptidos bioactivos galanina, spexina y kisspeptina, son filogenéticamente relacionados y descendientes de un gen ancestral común, cuyas funciones fisiológicas se siguen investigando. Se considera que intervienen en la regulación del metabolismo, la función de las células β pancreáticas, la homeostasis energética, el estado de ánimo y el comportamiento en varias especies, como el pez cebra (*Danio rerio*), roedores y seres humanos (Mills et al., 2021). Ambos péptidos, galanina (GAL) y spexina (SPX) son dos neuropéptidos multifuncionales que comparten los receptores GAL 1, 2 y 3, y que varios estudios han demostrado funciones en la regulación energética, la reproducción y la respuesta al estrés. El SPX actúa como factor de saciedad para suprimir la ingesta de alimentos, mientras que la GAL tiene efecto contrario como factor orexigénico, y modula la actividad de las neuronas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) en el cerebro y de las células gonadotrópicas en la hipófisis (Mohd Zahir et al., 2022)

Aunque se sabe que la GAL interviene en el cuidado parental en roedores, asociados a la alimentación, sin embargo, en los peces, sigue siendo poco conocido, pero en el pez cíclido

Astatotilapia burtoni, el papel de GAL mostró comportamientos importantes en la alimentación y el cuidado materno (Butler et al., 2020).

Las evidencias sugieren un posible papel en la regulación de la reproducción en peces, lo cual se probó al aislar y caracterizar dos transcritos alternativos de GAL en lubina europea (*Dicentrarchus labrax*), que codificaron para dos prepro péptidos (gal_MT853221) y (gal_MT853222), de 29 y 53 aminoácidos respectivamente, ambos expresados en cerebro, hipófisis y gónadas, y parecen estar regulados de forma diferencial en machos y hembras. En los machos, gal_MT853222 en el hipotálamo y gal_MT853221 en la hipófisis, lo que sugiere la posible implicación de GAL producida localmente en la gametogénesis y que su producción está regulada de forma diferencial en las gónadas masculinas y femeninas (Martins et al., 2021).

1.3.2 Neuropéptidos anorexigénicos

Se ha descrito que factores anorexigénicos identificados primeramente en mamíferos, también son expresados en cerebro y tejidos periféricos de teleósteos. Algunas de estas neurohormonas son bombesina y el factor de liberación de corticotropina (CRF), a nivel cerebral. Mientras los neuropéptidos colecistoquinina (CCK), leptina y taquicininas se expresan principalmente en órganos del sistema gastrointestinal, tales como el intestino (Lin, Volkoff, et al., 2000).

Hasta ahora, se desconoce exactamente la forma en la cual las señales anorexigénicas y orexigénicas son reguladas molecularmente en peces; sin embargo, se ha descrito la abundante presencia del receptor de la hormona leptina en áreas del hipotálamo involucradas en el control del apetito en peces (Yan, et al., 2016).

1.3.2.1 Hormona liberadora de corticotropina (CRH)

La hormona liberadora de corticotropina (CRH), denominada primeramente factor de liberación de corticotropina (CRF) hasta su caracterización, y considerada la neurohormona hipotalámica del eje corticotrópico, también conocido como eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal (HPA) implicado en el control de respuesta al estrés. La CRH controla la producción de corticotropina (ACTH) en la pituitaria, que a su vez controla la producción de corticosteroides en las glándulas suprarrenales en mamíferos, aves y reptiles, y por los interrenales en anfibios y teleósteos (Rousseau et al., 2021; D. Yuan et al., 2021).

En vertebrados, la hormona liberadora de corticotropina (CRH) es un neuropéptido hipotalámico, que pertenece a la familia de neuropéptidos, que incluye urocortinas, urotensina I y sauvagina, donde, la CRH y la urocortina actúan como factores anorexígenos para la regulación de la saciedad (Matsuda, 2013). En mamíferos, se sabe que CRH induce la liberación de hormonas adenohipofisarias como la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), β -endorfina, y la hormona estimulante de los melanocitos α (MSH) de la pituitaria; además se sabe que estos péptidos desempeñan múltiples funciones en el desarrollo animal y también en la adaptación fisiológica y conductual al medio ambiente (Kubota et al., 2012).

En muchos vertebrados, la familia de péptidos de la hormona CRH consta de cinco miembros (CRH1, CRH2, UCN/UTS1, UCN2 y UCN3), cuyos genes difieren en el patrón de expresión, así como en la afinidad del receptor, lo que les permite utilizar a una amplia gama de funciones en una variedad de especies, y que a nivel cerebral presentan características espaciales de expresión conservadas y diferenciadas (Grone et al., 2021). Los cinco genes existen en representantes de peces cartilaginosos, peces de aletas rayadas y peces de aletas lobuladas (Cardoso et al., 2020).

En mamíferos se ha estudiado la relación social del estrés, reduciendo así la respuesta de cortisol o corticosterona a un determinado factor estresante. Estudios recientes en peces sugieren que también ocurre en especies solitarias, especies gregarias que forman grupos sueltos y especies con estructuras y vínculos sociales bien definidos (Gilmour y Bard, 2022).

1.3.2.2 Transcrito relacionado con cocaína y anfetaminas (CART)

El transcrito relacionado con cocaína y las anfetaminas (CART) es un neuropéptido descubierto por primera vez en el cuerpo estriado del cerebro de ratas. Posteriormente, se descubrió que la secuencia genética y la función del péptido se conservaba entre diferentes especies de mamíferos, donde la expresión del ARNm de CART se ha observado ampliamente en todo el sistema nervioso central y periférico, lo que sugiere que tienen un papel en diversas funciones fisiológicas en respuesta a los estados metabólicos (Singh et al., 2021).

Aún no está claro como las actividades antagonicas de CART y NPY en la modulación de la plasticidad del circuito, ya que complejamente tienen potentes funciones anoréxicas y orexigénicas, respectivamente, y la expresión depende del estado energético en las neuronas interoceptivas (Bodas et al., 2023).

Estudios realizados con salmón atlántico (*Salmo salar*), reveló la existencia de 10 CART parálogos: cart1a, 1b1, 1b2, 2a, 2b1, 2b2, 3a1, 3a2, 3b, y 4.; de manera general, las secuencias de compartían entre el 19 y el 50% de identidad con el homólogo humano, y entre el 25 y el 90% de identidad de secuencia entre los parálogos, excepto Cart4, que sólo compartía entre el 18 y el 23% de identidad (Kalananthan et al., 2021).

El péptido CART desempeña un papel clave en la homeostasis energética en todos los vertebrados, demostrado mediante la utilización de renacuajos prometamórficos de *Euphlyctis cyanophlyctis* en ayuno o inyectando glucosa o 2-deoxiD-glucosa intracranealmente (2DG; un antagonista de la glucoprivación inducida por glucosa), cuyos resultados mostraron que la administración de glucosa aumentó la inmunorreactividad CART en las neuronas entopedunculares (EN), el área preóptica (POA), el hipotálamo ventral (vHy) y el núcleo de Edinger Westphal (EW), mientras que las células CART positivas disminuyen en respuesta al ayuno y la glucoprivación (Shewale et al., 2021).

La respuesta al estrés y las funciones específicas de las diferentes vías reguladoras en los peces, en particular la regulación de los genes del apetito como consecuencia de la exposición a diferentes factores estresantes como la manipulación del tanque, exposición al aire y recompensa de alimento en carpas koi (*Cyprinus carpio*), donde se investigaron genes orexigénicos y anorexigénicos en cuatro regiones cerebrales diferentes (telencéfalo, hipotálamo, tectum óptico y rombencéfalo), cuyos resultados mostraron que además de la regulación del apetito en las diferentes regiones cerebrales, también mostraron respuestas pronunciadas de los genes del apetito a los diferentes factores estresantes, con cambios en expresión genética en las diferentes investigadas (Pawlak et al., 2023).

1.4 Respuesta de los peces al estrés

Conocer las diversas respuestas de los peces al estrés es de gran relevancia, así como la variación que pueda ocurrir a nivel fisiológico, considerando que éstos tienen variaciones importantes entre individuos dentro de la misma especie, y entre poblaciones (Gorissen y Flik, 2016), tomando en cuenta que un entorno que cambia constantemente, es de vital importancia lograr buenos niveles de adaptación, ya que puede presentar estímulos para genera cualquier forma de estrés (Schreck y Tort, 2016).

El término estrés, debería limitarse a las condiciones en las que una demanda medioambiental excede la capacidad regulatoria de un organismo (Koolhaas et al., 2011). La presencia del agente

estresor puede ser agudo (minutos a horas) o crónico (días a semanas), al igual que la respuesta fisiológica del animal (Ferrari et al., 2006). El estrés ocurre cuando la homeostasis es amenazada o percibida como tal; en este sentido, las hormonas neuroendocrinas desempeñan un papel importante en la regulación de homeostasis basal, como respuestas a las amenazas (Figura 2)

Los peces y otros vertebrados sometidos a desafíos y factores estresantes muestran una serie de respuestas que involucran muchos compartimentos y mecanismos fisiológicos; y bajo estas situaciones de carga alostática impuesta, los sistemas de regulación endocrino e inmunológico ejercen un papel primordial en la organización de la respuesta (Khansari et al., 2017).

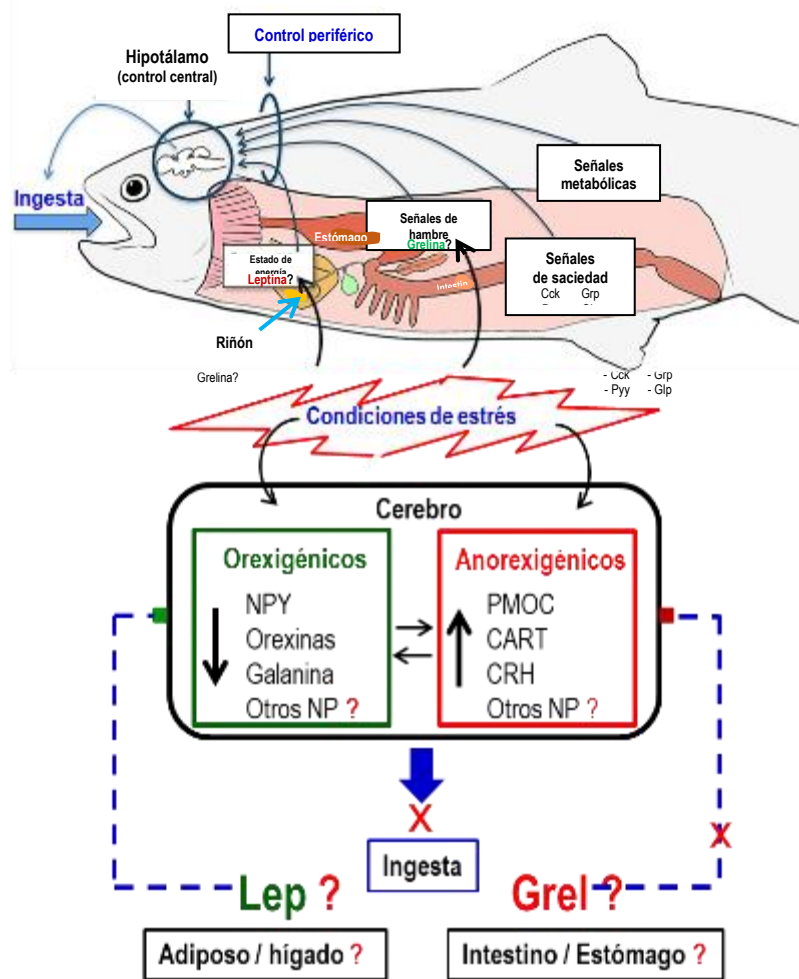


Figura 2. Modulación de la alimentación mediante neuropéptidos: Estrés y señales fisiológicas modulan la expresión de neuropéptidos implicada en la ingesta de alimento de los peces. Leptina (Lep) y grelina (Ghr1) podrían ser reguladores clave de la vía reguladora de la alimentación animal. (Extraído y modificado de Rønnestad et al. 2017).

Los estímulos que generan estrés son percibidos inicialmente por el sistema nervioso central, específicamente en el hipotálamo, donde se estimulan dos grandes ejes de regulación: el eje de células cerebro-simpático-cromafin (BSC) y el eje hipotalámico-hipófisis-interrenal (HPI)

(Pijanowski et al., 2015). En este contexto, se destaca que el centro de control de la ingesta de alimentos se encuentra muy cercano a las áreas del tejido hipotalámico que inician la respuesta de estrés en peces (Rønnestad et al., 2017).

La magnitud y duración de la respuesta al estrés está asociada a la severidad y extensión del estresor, ya que, si dichos estímulos son inicialmente percibidos por el sistema nervioso central, producirán una respuesta mediante la activación del eje HPI con la liberación de cortisol (Gorissen y Flik, 2014), por lo que se sugiere que la selección de reproductores de peces con una respuesta reducida de cortisol al estrés, tendría beneficios en la resistencia a enfermedades, rendimiento reproductivo y mayor tasa de crecimiento (Pickering, 1993). La respuesta endocrina al estrés es fundamental en la fisiología de los vertebrados, donde la hormona cortisol dirige los flujos de energía para el funcionamiento óptimo bajo estas condiciones, en la que la homeostasis puede estar en riesgo (Schulte, 2014). En peces teleósteos, se han descritos muchas similitudes con la de los vertebrados terrestres, pues incluye mensajeros del eje de las células cerebro-simpático-cromafín BSC (equivalente del eje de la médula suprarrenal cerebral-simpático) y el eje cerebro-pituitario-interrenal (equivalente del eje cerebro-pituitario-adrenal), donde sus funciones incluyen la estimulación de la absorción y transferencia de oxígeno, la movilización de sustratos de energía, la reasignación de energía opuesto al crecimiento y la reproducción, así como efectos supresivos de las funciones inmunitarias (Wendelaar, 1997).

Debido a los diversos efectos de cortisol, la elevación de su concentración plasmática es el indicador de estrés más comúnmente utilizado en teleósteos; no obstante, cuando el cortisol plasmático se reduce a niveles basales, los peces aún pueden estar respondiendo al agente estresor (Reid et al., 1998 ;Khansari et al., 2017), lo que hace que el cortisol plasmático sea propenso a falsos negativos; incluso los anestésicos utilizados para facilitar el muestreo de sangre alteran su concentración sanguínea (Metz et al., 2015; Vijayan y Leatherland, 1990). De este modo, un enfoque molecular podría determinar de mejor manera una condición de estrés crónico, a través del análisis de cambios en la expresión génica de biomarcadores involucrados en las respuestas fisiológicas, alteradas por condiciones de estrés, tales como la regulación de la ingesta de alimento. Al respecto, en humanos se describe que la hormona grelina se relacionaría directamente el sistema de factores liberadores de corticotropina y el estrés crónico (Diz-Chaves, 2011).

1.5 Estrés inducido por hipoxia

La hipoxia ambiental se define como la presión parcial de oxígeno del agua (PO_2). La hipoxia puede ocurrir cuando función fisiológica está comprometida, y ocurre en situaciones donde los requerimientos de O_2 en los tejidos, exceden el suministrado de O_2 circulatorio; esto podría evidenciarse durante ejercicios, temperaturas extremas, anemia, acidosis y cambios en la estructura de las branquias (Farrell y Richards, 2009).

En el medio natural, cuando los peces se ven enfrentados a ambientes hipóxicos, rápidamente migran hacia zonas más oxigenadas, evitando los daños fisiológicos asociados a una menor disponibilidad de este elemento. Esto fue demostrado por Stehfest et al. (2017) en salmón atlántico (*Salmo salar*) en jaulas flotantes, cuyos resultados revelaron que los individuos prefirieron soportar temperaturas más elevadas (16.5 a 17.5 °C), para evitar zonas con baja concentración de OD (<35%) en la parte inferior de la jaula.

Por otro lado, resultados obtenidos con carpa dorada (*Carrasius auratus*) sometida a hipoxia, reveló que los peces estresados alteraron sus movimientos para disminuir el consumo de oxígeno, observando un cambio en su centro de gravedad, así como la reducción de velocidad de natación y aumento en el movimiento de la dirección vertical (Israeli, 1996).

La capacidad de los organismos para adaptarse a los entornos cambiantes varía según la especie y las poblaciones, desconociéndose en gran medida los mecanismos de adaptación. Los factores ambientales estresantes como la temperatura, el oxígeno y la exposición a xenobióticos, inician complejas respuestas al estrés, que incluyen el estrés oxidativo y la activación de moléculas de señalización relevantes como el factor inducible por hipoxia-1 α (HIF-1 α) (Lotta, 2016).

El factor inducible por hipoxia, (HIF-1 α), es un complejo proteico que incrementa la expresión de genes específicos en presencia de bajas concentraciones de oxígeno, el cual contiene una subunidad reguladora “alfa” y una subunidad constitutiva “beta”, que pertenecen a la familia de los factores de transcripción bHLH/PAS [proteínas que contienen además del dominio bHLH (por sus siglas en inglés “basic helixloop hélix”), un dominio PAS (“Per Arnt Sim) (Grau, 2012).

Los HIF-1 α son cruciales para regular una diversidad de actividades celulares en respuesta al estrés por oxígeno (hipoxia). De manera general, en todos los estudios realizados se produjeron cambios inducidos por leptina en la expresión de los niveles hipotalámicos y una disminución de la ingesta de alimentos en respuesta a la hormona, lo que reforzó la naturaleza hipotalámica de los cambios implicados en los efectos anoréxicos de la leptina (Audira et al., 2018).

Estudios realizados con tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentada con dieta normal (5,95% de grasa) en hipoxia, y alimentadas con dietas ricas en grasas HFD (11,8% de grasa) a dos niveles de oxígeno disuelto ($1,1 \pm 0,1$ y $7,2 \pm 0,1$ mg/L) durante 8 semanas, mostraron resultados evidentes, donde la hipoxia y la HFD tuvieron efectos similares en la inducción de la deposición de lípidos, reducción del contenido de proteínas, aminoácidos de la carne, los valores de pH y la capacidad de retención de agua. Además, la combinación de hipoxia y HFD redujo significativamente la ingesta de alimento, la tasa de supervivencia y el contenido de proteína muscular, pero no afectó a los parámetros relacionados con la calidad de la carne (Lv et al., 2021).

1.6 Estrés inducido por densidad de cultivo

Numerosos estudios que han utilizado indicadores de comportamiento de bienestar animal muestran que los cambios de comportamiento pueden interpretarse como bienestar bueno o malo, dependiendo de la especie de pez, por lo que es fundamental comprender la biología específica de la especie, evaluando el bienestar de todo el grupo, incluyendo la distribución espacial (Martins et al., 2012).

La densidad de siembra en sistemas de cultivo es otra variable que merece mucha atención, ya que puede producir diversos efectos, entre estos, ineficiencia en la alimentación, lo que puede provocar un bajo crecimiento y aumento de las tasas de mortalidad (Montera et al., 1999). Por otra parte, una densidad de siembra inadecuada puede producir estrés crónico, que a su vez podría alterar el estado metabólico del animal, promoviendo la movilización de fuentes de triglicéridos para la gluconeogénesis del glicerol, tal como lo sugieren Vijayan et al. (1990) y Lulhier et al. (1999), en estudios con tilapia del Nilo.

Lorenzen y Enberg, (2002), encontraron relación inversa entre las estimaciones de la disminución de la longitud asintótica por unidad de densidad de biomasa, y la densidad media de biomasa a largo plazo de la población, es decir, que el crecimiento puede estar asociado a la densidad de siembra. También se ha descrito que las lubinas (*Dicentrarchus labrax*) mantenidas a altas densidades de siembra, muestran una reducción en la velocidad de natación y reducción de la ingesta de alimento, afectando el crecimiento.

Estudios realizados con lenguado (*Solea solea*) criado a diferentes densidades de cultivo (0,56 y 12,6 kg/m²) durante 55 días, a medida aumentó la densidad de población, disminuyó la calidad del agua, así como la tasa específica de crecimiento, y aumentó la tasa de mortalidad (Schram et

al., 2006). De igual manera, en un ensayo realizado con carpa maneó (*Labeo bata*) en jaulas, durante un período de 180 días, a tres densidades de cultivo (50 alevines m^{-3} , 75 alevines m^{-3} y 100 alevines m^{-3}); la primera densidad, mostró una tasa de crecimiento significativamente mayor ($p < 0,05$) ($1,08 \pm 0,02$), y de igual manera, una tasa mayor de supervivencia (84%), así como la conversión alimenticia y la eficiencia proteica, que los criados a 75 alevines m^{-3} y 100 alevines m^{-3} . En contraste, el crecimiento y la supervivencia fueron menores con una densidad de 100 alevines m^{-3} (Karnatak et al., 2021)

De igual manera, se midió la ingesta de alimentos, las tasas de crecimiento y tasas de consumo de oxígeno en salvelinos árticos (*Salvelinus alpinus*), criados en densidades baja (15 $kg \cdot m^{-3}$), media (60 $kg \cdot m^{-3}$) y alta (120 $kg \cdot m^{-3}$). Las respuestas con relación a las tasas de crecimiento fueron similares con densidades media y alta, pero se redujeron notablemente con la densidad de repoblación más baja. Los bajos niveles de ingesta de alimento fueron probablemente también la razón principal de las bajas tasas de consumo de oxígeno registradas en los grupos de peces repoblados a baja densidad, por lo tanto la densidad de población pudo haber afectado la conducta de los peces, observándose un comportamiento de cardumen en los grupos sometidos a densidad de población media y alta, y por consiguiente, es posible que las limitaciones sociales debidas a la formación de jerarquías de dominancia no hayan sido la razón principal de los cambios en el apetito y la ingesta de alimentos en los grupos mantenidos a baja densidad (Jorgensen et al., 1993).

Lorenzen y Enberg, (2002), encontraron relación inversa entre las estimaciones de la disminución de la longitud asintótica por unidad de densidad de biomasa, y la densidad media de biomasa a largo plazo de la población, es decir, que el crecimiento puede estar asociado a la densidad de siembra.

Una percepción general, es que el bienestar de los animales disminuye con el aumento de la densidad, debido al incremento de cortisol en sangre (Iiyasu et al., 2016; Martins et al., 2012); sin embargo, se ha descrito que bajas densidades también pueden provocar estrés crónico (Yarahmadi et al., 2016), que es el caso de la trucha ártica (*Salvelinus alpinus*), cuyos individuos cultivados a bajas densidades (15 kg/m^3) presentaron altos niveles de cortisol, además de mostrar menor crecimiento que aquellos cultivados a 60 kg/m^3 y 100 kg/m^3 (Mazur y Iwama, 1993). Resultados similares han sido descritos por Li et al., (2012) en cultivos de trucha (*Oncorhynchus mykiss*), gran esturión (*Huso huso*) (Rotllant, 1997) y pez gato (*Clarias gariepinus*) (Adams et al., 2005), lo que demuestra que el conocimiento sobre los efectos de la densidad de población en una especie de pez, no puede ni debe aplicarse directamente a otras especies, y por lo tanto, este parámetro debe

ser analizado específicamente para *C. gilberti*, considerando las respuestas fisiológicas que puedan verse afectadas.

2. OBJETIVOS

2.1 General

Evaluar los efectos del estrés inducido por densidad de siembra e hipoxia en los niveles transcripcionales de las hormonas reguladoras del apetito Grelina y Leptina en juveniles de *Cilus gilberti*.

2.2 Específicos

- Caracterizar la secuencia de los transcritos de leptina, grelina y sus receptores, y analizar su expresión en tejidos de *C. gilberti*
- Analizar la expresión génica de leptina y grelina en tejidos de juveniles *C. gilberti* mantenidos a diferentes densidades de cultivo
- Evaluar la expresión génica de leptina y grelina en tejidos de juveniles *C. gilberti* mantenidos a diferentes periodos de hipoxia

3. HIPOTESIS

H1: Altas densidades de cultivo incrementan la expresión de leptina y disminuye la expresión de grelina en tejidos de *C. gilberti* juveniles

H2: Periodos de hipoxia incrementan la expresión de leptina y disminuyen la expresión de grelina en tejidos de *C. gilberti*

4. CAPITULO I: CARACTERIZACIÓN Y PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LEPTINA DE *Cilus gilberti* EN RESPUESTA A HIPOXIA Y DENSIDAD DE CULTIVO

Reeditado a partir de:

Juan F. Alvarado. 2024. Characterization and gene expression profiles of *Cilus gilberti* leptin in response to culture parameters. *Aquaculture* 37 (2024) 102273. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2024.102273>.

Juan F. Alvarado. 2024. Caracterización y perfiles de expresión génica de leptina de *Cilus gilberti* en respuesta a parámetros de cultivo. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2024.102273>

4.1 Resumen

La corvina chilena (*Cilus gilberti*), surge como una especie novedosa para la acuicultura sudamericana, sin embargo, el establecimiento exitoso de su cultivo requiere una cuidadosa consideración de los parámetros productivos y de la tolerancia a estresores abióticos. Para hacer frente a estos desafíos; donde la identificación de biomarcadores emerge como un enfoque prometedor. De hecho, la leptina destaca como un biomarcador potencial, dado su papel multifacético. Este estudio se centra en la caracterización de la leptina en *C. gilberti* (cgLep) y en la evaluación de su expresión génica en juveniles expuestos a diferentes condiciones de cultivo y alimentación. Los resultados indicaron que la secuencia codificante de cgLep produce una prohormona de 137 aminoácidos, conservando residuos de cisteína de gran relevancia para mantener su integridad estructural. De igual manera, los perfiles de expresión génica basal de dicha hormona revelan su expresión principalmente en el hígado, seguido del músculo blanco. Por el contrario, su receptor (cgLepR) muestra niveles más altos en músculo blanco. Además, se observó que los juveniles en estado posprandial mostraron una regulación al alza de cgLep hepática. Simultáneamente, cgLepR mostró un aumento significativo a nivel cerebral durante la etapa preprandial. Por otra parte, la exposición a la hipoxia aguda reveló una notable regulación al alza de cgLep después de dos horas de baja disponibilidad de oxígeno y volvió a la línea de base de normoxia después de seis horas post-hipoxia. Notablemente, cuando se sometió a un régimen prolongado de hipoxia diaria, no se observaron diferencias significativas en la expresión de ARNm de leptina. Esto sugiere una respuesta adaptativa dinámica del sistema de leptina de *C. gilberti* a la hipoxia. Finalmente, los juveniles de la especie descrita, cultivados a 15 Kg/m³ mostraron una variabilidad individual significativa en los niveles de expresión hepática de leptina, en comparación con los cultivados a 25 o 35 kg/m³. Estas observaciones ponen de manifiesto que la leptina se expresa principalmente en el hígado y que su expresión está notablemente influenciada por los periodos de ayuno, y el estrés crónico inducido por la baja densidad de población. Esta variabilidad en la expresión de la leptina podría potencialmente impactar en la ingesta de alimento, enfatizando la importancia de considerar estos factores en el diseño e implementación de prácticas de acuicultura para la corvina chilena.

4.2 Introducción

La leptina, una hormona pleiotrópica que se encuentra tanto en mamíferos como en peces, desempeña un papel fundamental en la regulación de un amplio espectro de procesos fisiológicos, como el apetito, el metabolismo lipídico, el crecimiento, la reproducción, el estrés y la respuesta inmunitaria. A pesar de su papel en los vertebrados, las propiedades funcionales de la leptina muestran divergencias intrigantes entre los teleósteos, lo que sugiere una adaptación específica que la especie puede estar intrincadamente vinculada a las variaciones en los comportamientos alimentarios y los hábitats ambientales (Friedman, 2015; Deck et al., 2017).

La leptina en su forma precursora, conocida como propéptido, carece de glicosilaciones, y presenta una elevada hidrofiliidad e incluye una señal secretora aminoterminal de 21 aminoácidos, que se elimina antes de su liberación al torrente sanguíneo. En particular, en el pez globo, el propéptido está compuesto por 137 aminoácidos, 15 aminoácidos menos que su homólogo de mamíferos. Aunque solo comparte un 13 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la leptina humana, el propéptido del pez globo conserva residuos cruciales esenciales tanto para su actividad como para su integridad estructural (Vissers et al., 2013.). En mamíferos, la síntesis y liberación de leptina se realiza principalmente por el tejido adiposo, respondiendo a los niveles de depósitos de grasa. Por el contrario, en los peces teleósteos, el hígado se ha descrito como el sitio primario de producción de leptina (Blanco y Soengas, 2021), sin embargo, la capacidad de síntesis de transcritos de esta hormona también está documentada en varios tejidos, incluyendo el cerebro, las gónadas, músculo y riñón. Estos tejidos presentan perfiles de expresión distintos, lo que pone de relieve las variaciones entre especies en la distribución y función de la leptina (Won et al., 2012).

En mamíferos, la leptina, además de suprimir los péptidos orexigénicos y estimula los péptidos anorexigénicos y se complementa con las acciones de la hormona colecistoquinina (CCK) que responde a la presencia de nutrientes (Laigneau y Moizo, 1998); sin embargo, la síntesis y liberación de leptina la realiza principalmente en tejido adiposo, respondiendo a los niveles de depósitos de grasa.

4.3 Leptina y su receptor

La capacidad de síntesis de transcritos de la leptina también está documentada en varios tejidos, incluidos el cerebro, las gónadas, los músculos y los riñones. Estos tejidos exhiben distintos perfiles de expresión, destacando las variaciones entre especies en la distribución y función de la leptina

(Won et al., 2012b), y ejerce su acción sobre diferentes tejidos, mediante el reconocimiento por su receptor (LepR), también conocido como ObR, por su relación con la obesidad en humanos (Shaikh et al., 2018). Sorprendentemente, en los peces se ha documentado la presencia de una isoforma de leptina con mayor afinidad por su receptor, mediante investigaciones con el pez cebra (*Danio rerio*) y el pez arroz japonés (*Oryzias latipes*) se demostró que la isoforma A exhibe una afinidad de unión superior al receptor en comparación con la isoforma B (Prokop et al., 2012). En consecuencia, las investigaciones que exploran la caracterización y los roles funcionales de la leptina en especies de peces recientemente estudiadas se concentran en la isoforma A de la hormona (Figura 15).

En mamíferos la leptina se une a un receptor específico (LepR) que tiene numerosos subtipos (LepRa, LepRb, LepRc, LepRd, LepRe y LepRf) (Wada et al., 2014). Los LepRb son generados por procesamiento alternativo de un único ARNm y/o por procesamiento proteolítico, y poseen una

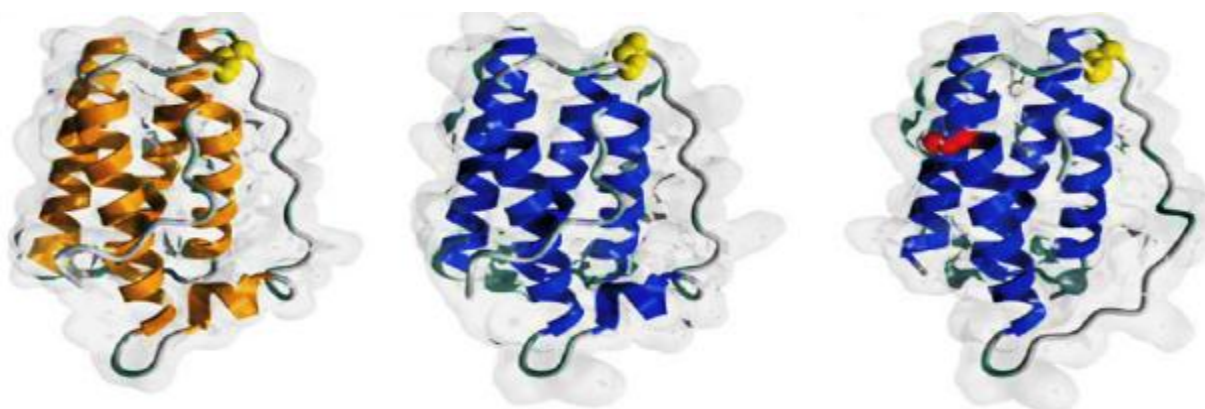


Figura 3. Estructura terciaria de leptina humana (A), leptina-a (B) y leptina-b (C) del pez cebra (*Danio rerio*). En amarillo se ha representado el puente disulfuro que estabiliza la estructura terciaria y en rojo la tercera cisteína de la leptina-b. Extraído de Gorissen et al. 2009

estructura muy similar a los de receptores de citoquinas de clase I (Sweeney, 2002).

En trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), se ha descrito la presencia de dos isoformas del receptor de leptina denominadas receptor de leptina de forma larga (LepRL) y receptor de leptina de forma corta (LepRT), los cuales son generados por empalmes alternativos con dominios extracelulares y transmembranas idénticos, que difieren en longitud, de 300 y 39 aminoácidos respectivamente, así como la identidad en secuencias (Gong y Björnsson, 2014).

El receptor de leptina de peces (LepR) es relevante en la regulación de muchas funciones fisiológicas, tal como se muestra en un estudio con pez cebra adulto (*Danio rerio*), donde se evaluó la expresión del gen leptina y su receptor en intestino en periodo de alimentación y ayuno, cuyos resultados apuntan la hipótesis que el papel de esta hormona desempeña una función en la regulación alimentaria (Garcia-Suarez et al., 2018), pues la unión a su receptor específico,

activaron la vía de señalización JAK/STAT (Janus Kinase/Signal Transducer an Activator of Transcription) (Hsuchou et al., 2009) induciendo la expresión de genes blanco en tejidos del sistema nervioso central y tejidos periféricos para el desarrollo de su actividad biológica (Hyeong-Kyu y Rexford, 2014).

Los mecanismos endocrinos que regulan el apetito en los teleósteos son similares a los de los mamíferos, aunque existe poca información sobre cómo leptina y su relación con la ingesta de alimentos. Esta falta de conocimiento es especialmente importante en las especies relevantes para la acuicultura, en las que las prácticas de producción intensiva a menudo las exponen a prolongados periodos de estrés durante el transporte, fluctuaciones de los parámetros ambientales, los cambios en los regímenes alimentarios o las alteraciones de la densidad de población.

De hecho, varios estudios han aportado pruebas iniciales sobre el impacto de estresores específicos en las señales endocrinas periféricas que regulan la ingesta de alimentos (Sun et al., 2017). Varias especies de peces muestran un comportamiento agresivo a la aparición de «individuos dominantes» y «subordinados», con diferencias notables en el comportamiento alimentario de estos dos grupos (Rønnestad et al., 2017).

Otros estudios han explorado diversos marcadores del apetito relativos a la densidad de cultivo, lo que sugiere que más allá de la integración de señales periféricas y centrales en el hipotálamo, desempeñan un papel importante las señales endocrinas periféricas de leptina. Estos datos ponen de relieve la intrincada interacción entre los factores sociales o ambientales y los mecanismos reguladores del apetito en especies de peces comerciales (Conde-Sieira et al., 2018).

Por ejemplo, Álvarez et al., (2023) observaron un aumento de la expresión del gen leptina en el hígado en salmón del atlántico (*Salmo salar*) a la mayor densidad evaluada (40 Kg/m³) comparado con el grupo control de 11 Kg/m³ después de 21 y 40 días de cultivo. Este hallazgo pone de relieve la posible influencia de la densidad de cultivo sobre la expresión de leptina, y sugiere una relación dinámica entre densidad de población y la regulación molecular de los genes relacionados con el apetito en especies de peces acuícolas.

Por otra parte, la baja disponibilidad de oxígeno disuelto (OD), es otro factor de estrés exacerbado por el cambio climático, que preocupa cada vez más a la industria acuícola mundial. Este fenómeno supone una amenaza cada vez mayor para los sistemas acuáticos, lo que lleva a un aumento de los casos de hipoxia por intensidad y frecuencia. Estos episodios de hipoxia son especialmente problemáticos en zonas de todo el mundo, donde se encuentran las granjas marinas, lo que añade un reto adicional al sector acuícola. Abordar el impacto de los bajos niveles de oxígeno

disuelto es cada vez más cada vez más imperativo a medida que el cambio climático sigue influyendo en la dinámica de los medios acuáticos (Pollock et al., 2007).

Bernier et al. (2012) realizaron un estudio con carpa común (*Cyprinus carpio*), expuestas a una saturación del 10% de O² durante ocho días, lo que resultó en una reducción sustancial del 79 % en consumo de alimento, en comparación con los peces mantenidos en condiciones normóxicas. El estudio sugiere que la supresión del apetito en respuesta a la hipoxia crónica puede atribuirse a la modulación de señales anorexigénicas, lo que subraya la intrincada relación entre los bajos niveles de oxígeno, la regulación del apetito y la posible implicación de la leptina en la mediación de las respuestas fisiológicas al estrés hipóxico en los peces (Bernier et al., 2012).

En los peces teleósteos, existen pruebas más sólidas que establecen una correlación directa entre los episodios de estrés y las alteraciones en la ingesta de alimentos. Reconocer y delinear los marcadores moleculares que interconectan estos dos procesos son imprescindibles para estandarizar varios parámetros de cultivo en piscicultura. Esto resulta especialmente crítico para las especies productivas, como *Cilus gilberti*, incluidas en programas de diversificación acuícola en Chile y Perú. Los resultados iniciales de productividad destacan a *C. gilberti* como una especie marina prometedora para el cultivo, en particular con capacidad de crecimiento a densidades superiores a 35 Kg/m³ (Álvarez et al., 2020).

Sin embargo, es necesario un examen exhaustivo sobre condiciones que ejercen efectos más amplios en diversos procesos fisiológicos, identificar y comprender los marcadores moleculares asociados con el estrés y la ingesta de alimentos en *C. gilberti*, es fundamental para optimizar las prácticas acuícolas, y así contribuir al éxito de las iniciativas de cría y garantizar una producción sostenible en el contexto de esta industria. Para abordar esta necesidad, este estudio se centró en la caracterización de la leptina y su receptor en juveniles de *C. gilberti*, durante periodos de alimentación pre y posprandiales. Además, se investigó la expresión génica bajo diferentes densidades de cultivo y en respuesta a eventos de hipoxia aguda y crónica. El análisis molecular exhaustivo proporcionará valiosos conocimientos en la intrincada interacción entre la señalización de la leptina, el estado de ayuno y las respuestas fisiológicas de *C. gilberti* a diferentes variaciones ambientales y condiciones de cultivo.

4.4 Expresión de leptina en peces

De manera general, se sabe que la leptina actúa como una hormona anorexigénica, ya que su promueve la disminución de la ingesta de alimentos en vertebrados, sin embargo, en los peces la paradoja funcional surge de situaciones contradictorias, observándose que los niveles de expresión de la leptina y su receptor está influenciado por numerosos factores, como los esteroides sexuales, y las catecolaminas inducidas por el estrés y el glucocorticoide, lo que requiere mayores estudios (Bakshi et al., 2022).

A pesar de su papel en los vertebrados, las propiedades funcionales de la leptina exhiben divergencias intrigantes entre los teleósteos, lo que sugiere una adaptación específica de cada especie que puede estar estrechamente relacionada con variaciones en los comportamientos alimentarios y los hábitats ambientales (Deck et al., 2017; Friedman, 2015).

Estudios realizados con salmón Atlántico (*Salmo salar*) alimentados hasta la saciedad (100%), se reportaron altos niveles de leptina A1 (sLepA1) en ARNm en cerebro, músculo blanco, hígado y ovarios, sin embargo, Rønnestad et al., (2010) reportó expresiones más bajas de leptina A2 (sLepA2) en los mismos tejidos. Además, Trombley et al. (2012) describió que la expresión de receptores de leptina se incrementó durante el período de crecimiento y disposición de lípidos, principalmente a nivel hepático.

Por otra parte, se ha propuesto que en pez cebra (*Danio rerio*) y pez arroz japonés (*Oryzias latipes*), la isoforma A presenta mayor afinidad por el sitio de unión a su receptor que la isoforma B (Prokop et al., 2012a).

La leptina, a través de su interacción con el receptor, desencadena la modulación de la función celular en diferentes tejidos mediante la activación de la vía de señalización JAK/STAT. (Janus Kinase / Transductor de señal y activador de la transcripción) (Hsuchou et al., 2009). Esta modulación celular conduce a una alteración en la expresión de genes diana dentro de los tejidos que expresan el receptor, lo que contribuye a las acciones pleiotrópicas de la leptina (Ahima y Osei, 2004; Park y Ahima, 2014).

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 Recepción y mantenimiento de peces

En esta investigación se utilizaron juveniles de *C. gilberti* procedentes de las instalaciones de Fundación Chile, ubicadas en la Bahía de Tongoy, Coquimbo, Chile. Posteriormente, los peces fueron llevados al laboratorio de piscicultura de la Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Católica del Norte en Coquimbo. Durante la fase de aclimatación los peces fueron alojados en tanques de 1 m³, con monitoreo diario de temperatura ($16,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$), oxígeno disuelto (OD) de $7,5 \text{ mg/mL} \pm 0,5$ utilizando equipo multiparamétrico (Hanna), con un fotoperiodo de 12:12 (L/O). El régimen de alimentación consistió en una proporción del 1% de la biomasa, con dos raciones diarias suplementadas manualmente.

Los protocolos de estudio en animales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad Católica del Norte, sede Coquimbo (CEC UCN N° 01 12 de mayo 2020 y CEC UCN N° 05 22 marzo 2023).

5.2 Bioensayo de hipoxia aguda

Para este bioensayo, se utilizaron 36 peces juveniles de *C. gilberti* con una masa total media de 64,5 g, y se distribuyeron uniformemente en seis tanques de 40 L. Tres tanques se mantuvieron en condiciones normóxicas con un OD de $7,5 \pm 0,5 \text{ mg/mL}$, mientras que los tres restantes se sometieron a eventos de hipoxia aguda (2 y 6 horas). Durante el procedimiento de hipoxia, se interrumpió el suministro de aire a los tanques y se les administró nitrógeno (N_2) en el agua hasta que la concentración de OD descendió a $2,0 \pm 0,5 \text{ mg/mL}$, y se mantuvo así durante 2 horas. Posteriormente, se volvió a introducir aire hasta que se restableció la condición normóxica, para luego someter a hipoxia por 6 horas, inyectando nitrógeno (N_2) en el agua, hasta alcanzar una concentración de $2,0 \pm 0,5 \text{ mg/mL}$. Durante todo el estudio, la temperatura en cada tanque se mantuvo rigurosamente a $16,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (Figura 4).

Tras exponerlos a condiciones de hipoxia durante 2 y 6 horas, se seleccionaron tres peces de cada tanque al azar. Simultáneamente, se eligieron tres individuos de cada tanque en condiciones de normoxia. Los peces seleccionados se colocaron en recipientes que contenían una solución anestésica de sobredosis (200 mg/L de Tricaína MS-222 en agua de mar). Se registraron las medidas de masa corporal (g) y longitud (mm) de cada pez, y se obtuvo una muestra de sangre de

la vena caudal, utilizando jeringa heparinizada. Las muestras fueron centrifugadas a 5000 x g durante 5 minutos a 4 °C, y la fracción plasmática se almacenó a - 20 °C. También se incluyeron los siguientes tejidos: estómago (E), riñón anterior (Ra), riñón posterior (Rp), ciegos pilóricos (Cp) intestino anterior (Ia), intestino posterior (Ip), corazón (C), músculo blanco (Mb), músculo rojo (Mr), hígado (H), branquias (Br), cerebro (C) y bazo (Bz), y se depositaron en dos tubos estériles con RNAlater® (Thermo Fisher) para su conservación. Estas muestras se almacenaron a - 80°C para su posterior análisis.

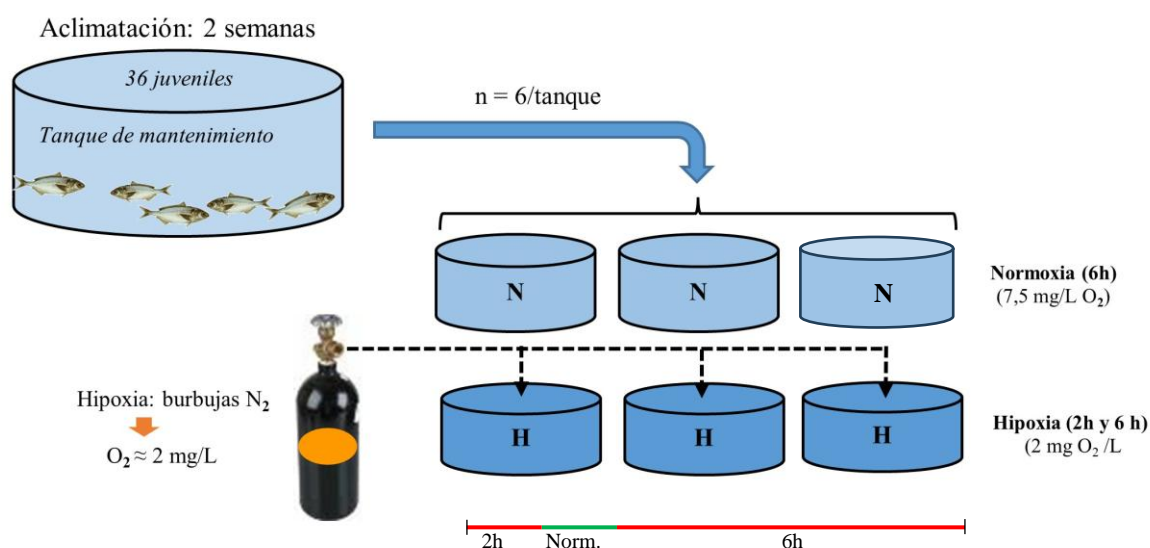


Figura 4. Bioensayo: Hipoxia aguda

De condición normóxica e hipóxica (2 y 6 h), se tomaron 3 peces de cada tanque, y se colocaron en recipiente con anestésico (200 mg/L de Tricaina MS-222 en agua de mar), se registró talla (mm), masa corporal (g), tomó muestra: sangre, y diferentes tejidos

5.3 Bioensayo de hipoxia intermitente

En este estudio se utilizaron aleatoriamente 200 juveniles corvina de *C. gilberti*, con una masa media de 200 g, y se distribuyeron en ocho tanques cónicos de 250 L, 25 peces por tanque, con agua de mar dentro de un sistema de flujo abierto, asegurando una temperatura estable de $16,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ y suficiente aireación (Figura 5). Tras un periodo de aclimatación de dos semanas, los peces se dividieron en dos grupos, cada uno con cuatro tanques.

El primer grupo, que sirvió de control, permaneció en condiciones normóxicas (7,8 mg/L de OD) durante todo el experimento, mientras que el segundo grupo fue sometido a eventos hipóxicos diarios (2 mg/L OD) 3 horas por día, 5 días por semana, regresando normoxia posteriormente. Los

intervalos utilizados fueron los siguientes: 0h, 15 y 30 días. Después de cada período, se tomaron muestras de hígado del grupo control y expuestos a hipoxia, mediante la metodología descrita en el bioensayo anterior.

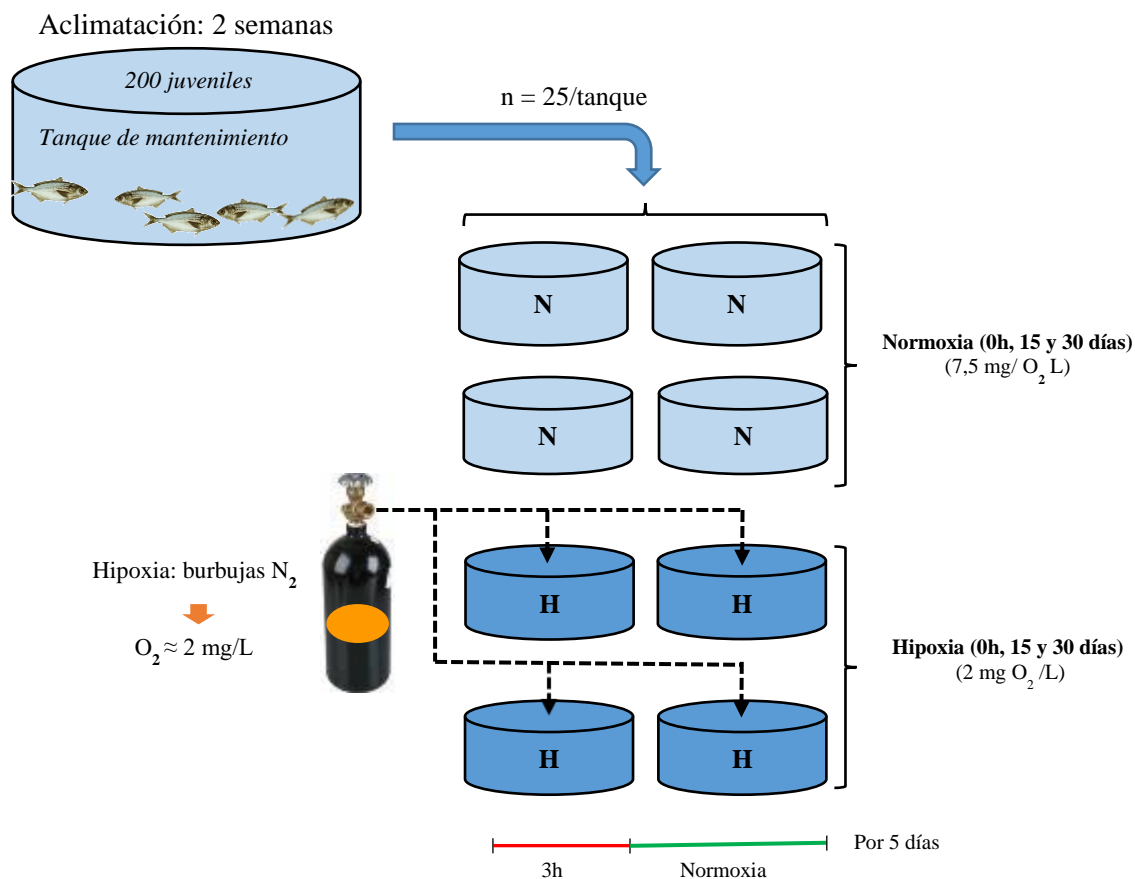


Figura 5. Bioensayo: Hipoxia intermitente

La condición hipóxica (2 mg O₂ /L) fue de 3 horas diarias, 5 días por semana; regresando posteriormente a normoxia.

Después de cada periodo (0h, 15 y 30 d), se tomaron muestras de hígado de ambos grupos en estudio. Después de cada periodo (0h, 15 y 30 d), se tomaron muestras de hígado de ambos grupos en estudio. Normoxia: 0h: 1 pez/tanque; 15d:2 peces/tanque; 30d:2 peces por tanque. Hipoxia (misma cantidad de peces)

5.4 Bioensayo pre y postprandial

Tras el periodo de adaptación, se trabajó dos grupos de cuatro tanques: uno para el muestreo preprandial y otro para el postprandial. De este modo se garantizó que los peces muestreados postprandialmente no fueran perturbados por el muestreo preprandial y, por tanto, tuvieran comportamiento alimentario normal (Vikeså et al., 2015). El muestreo preprandial fue llevado a cabo con 2 peces por tanque (Figura 6), y se realizó una hora antes del inicio de la primera comida diaria, mientras que el muestreo postprandial utilizando 2 peces por tanque, se realizó 1 h y 6 h

después de la primera comida de la mañana. Los peces muestreados fueron capturados y sacrificados mediante una sobredosis anestésica (200 mg/L de Tricaína MS-222 en agua de mar). Se registró el peso corporal (PC) y la longitud (cm), con los peces sedados. Además, se tomaron muestras de sangre de la vena caudal con jeringas heparinizadas de 1 mL y luego se centrifugaron a 5000g durante 5 min a 4 °C, almacenándose la fracción plasmática a -20 °C. Las porciones de tejido estomacal para la extracción de ARN se colocaron en tubos estériles que contenían 400 µL de RNAlater® (Thermo Fisher) y se almacenaron a -80 °C para su posterior análisis.

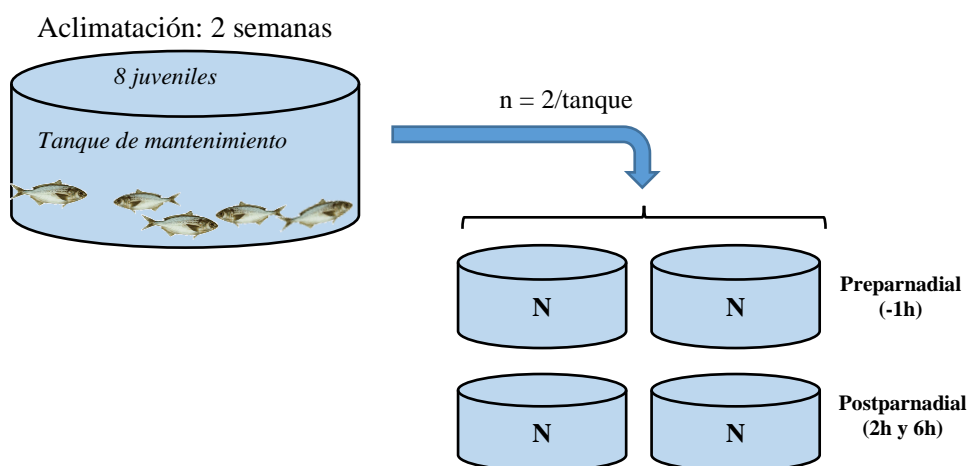


Figura 6. Bioensayo: Pre y Postprandial en corvina *C. gilberti*.

Se tomaron muestras de estómago (E), utilizando la misma metodología para el bioensayo de hipoxia aguda

5.5 Bioensayo de densidad de cultivo

Las muestras de hígado utilizadas en este estudio procedían de una investigación realizada por el equipo de investigadores coordinadas por (Álvarez et al., 2020), y se utilizaron peces juveniles de *C. gilberti* (n=2000, con un peso promedio 125 ± 15 g), los cuales fueron adquiridos en las instalaciones de Fundación Chile, ubicadas en la Bahía de Tongoy, Coquimbo, Chile, y posteriormente trasladados al Laboratorio de Piscicultura de la Universidad católica del Norte, en Coquimbo. Los peces se mantuvieron en tanques circulares de fibra de vidrio ($1,3 \text{ m}^3$) equipados con bombas de oxígeno, filtros biológicos, esterilizadores ultravioletas y flujo continuo de agua de mar. Se alimentaron manualmente tres veces al día (09:00 am, 14:00 pm y 17:30 pm, con periodo de adaptación de aproximadamente un mes, previo al experimento (Figura 7).

Tras la fase de adaptación, los peces fueron aleatoriamente distribuidos en nueve tanques, los cuales se dividieron en tres niveles de densidad de población (220 peces por tanque). El volumen de agua de cada tanque fue ajustado para mantener tres distintas densidades de población: 15, 25 y 35 Kg/m³ de biomasa de peces, clasificadas como densidad de población baja (DPB), densidad de población media (DPM) y densidad de población alta (DPA) respectivamente. Los peces fueron alimentados tres veces al día con pienso comercial durante un período de 120 días, retirándose diariamente el alimento sobrante.

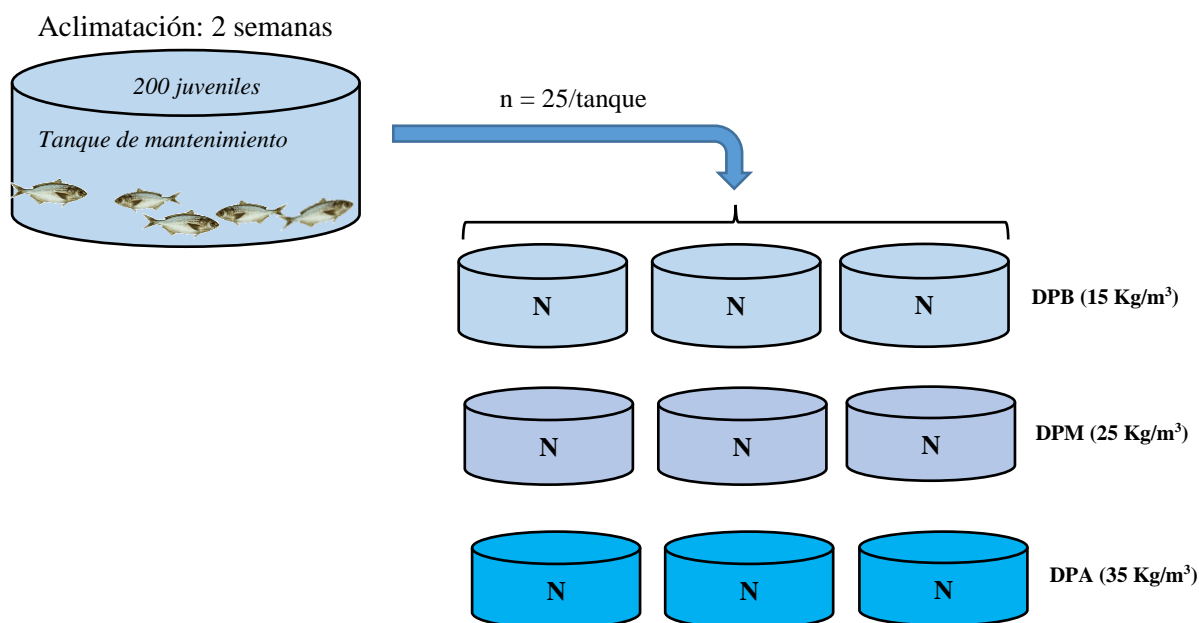


Figura 7. Bioensayo: Densidad de cultivo. Se tomaron muestras de hígado (H). a partir de 10 peces de cada tanque (30 en total).

A lo largo del experimento, se controlaron diariamente parámetros como el OD y la temperatura, con un fotoperiodo constante de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Al final del periodo experimental de 120 días, con un peso corporal medio de 368,1 ± 45,5 g (DPA), 358,3 ± 38,6 g (DPM), a 334,4 ± 43,8 g (DPB). Posteriormente se seleccionaron al azar 10 peces de cada tanque, con un total de 30 peces de cada grupo experimental. A estos peces se les practicó la eutanasia mediante una sobredosis de anestésico (200 mg/L de Tricaína MS-222 en agua de mar). Posteriormente, y se obtuvieron muestras de los siguientes tejidos: cerebro, estómago, hígado, intestino, músculo blanco, ciegos pilóricos y riñón, para posteriormente extraer ARNm. Las muestras de los tejidos se colocaron en tubos estériles que contenían 400 µL de RNAlater® (Thermo Fisher) y se almacenaron a - 80 °C antes del análisis.

5.6 Extracción de ARN, obtención de secuencias codificantes para leptina, y receptor de leptina de *C. gilberti*

La extracción de ARN de cada tejido inició añadiendo 500 µL de Trizol a 50 mg de tejido, seguido de homogeneización en un equipo Mini beat (Biospec, EE.UU.) durante 10 segundos, luego se centrifugó a 8000xg durante 10 minutos a 4 °C, y el sobrenadante se recuperó mediante posterior adición de 400 µL de cloroformo. Tras agitar en vórtex a temperatura ambiente, la solución se centrifugó a 12 000xg durante 15 minutos a 4°C. La capa superior transparente se transfirió cuidadosamente y se cargó en columnas comerciales del kit E.Z.N.A. (Omega Biotec), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se realizó la cuantificación del ARN (absorbancia) con el equipo Epoch (Microplate spectrophotometer BioTek), y se evaluó la integridad mediante electroforesis de agarosa.

Para realizar la transcripción inversa, se utilizaron 500 ng de cada muestra de ARN, utilizando el kit de transcripción inversa de ADNc de gran capacidad (Applied Biosystems™), siguiendo el protocolo del fabricante.

Para obtener las secuencias codificantes de la leptina y su receptor, se utilizaron partidores heterólogos dirigidos a regiones conservadas de las secuencias descritas para estos genes, en especies estrechamente relacionadas con *C. gilberti*. Los productos de PCR obtenidos se sometieron a secuenciación por la empresa Macrogen, República de Corea. Las secuencias resultantes se depositaron en GenBank con los códigos de acceso OQ954479.1 (cgLep), OQ954480.1 (cgLepR).

5.7 Análisis bioinformático

La secuencia parcial de codificación de la leptina (cgLep) y el receptor de leptina (cgLepR) de *C. gilberti* se obtuvieron a través de una búsqueda de secuencias contig (cóntigos) de secuencias proporcionada por Fundación Chile. Los partidores para amplificar estas secuencias se diseñaron utilizando el software Primer3 Input.

La homología de secuencias se determinó mediante el desarrollo de Herramienta Básica de Búsqueda de Alineamiento Local [(Basic Local Alignment Search Tool, BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)], y la secuencia de la proteína putativa se recuperó del portal Expasy (<http://www.expasy.org/>).

Las secuencias fueron expresadas en secuencias proteicas predichas por alineamiento con varias secuencias conocidas de leptina mediante el servidor en línea de alineación de secuencias múltiples ClustalW [(ClustalW multiple sequences alignment online server) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/mas/clustalw2/>)]. También se realizó análisis filogenético con la plataforma Phylogeny.fr (<http://www.phylogeny.fr/>) (Dereeper et al., 2008), utilizando el método de Máxima Verosimilitud de Saitou (Saitou, 1988). La robustez de los nodos se evaluó mediante el método bootstrap (N=1000 pseudoréplicas).

Los modelos bioinformáticos de estructura terciaria de la leptina putativa madura de *C. gilberti* se analizaron utilizando el servidor web I-TASSER (Iterative Threading Assembly refinement) (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>) (Yang y Zhang, 2015), para lo cual se eligió el mejor modelo y se construyó la estructura 3D del péptido utilizando el programa PyMOL.

5.8 Expresión génica por RT-qPCR

Las reacciones RT-qPCR se llevaron a cabo empleando mezclas de reacción de 10 µL que comprendían SYBR™ Green PowerUp™ (Applied Biosystems™), 0,3 µM (concentración final) de cada partidor, y 2 µL de ADNc. En primer lugar, se determinó la eficiencia de los partidores (E) mediante la ecuación: $E = 10^{(-1/\text{pendiente})}$. Los análisis se llevaron a cabo en un sistema de PCR en tiempo real Quant Studio 3 real-time (Thermo Fisher Scientific), utilizando el siguiente perfil térmico: un paso inicial de desnaturalización de 3 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de PCR con pasos de desnaturalización (95 °C, 15 s) e hibridación-extensión (60 °C, 15 s).

Los niveles relativos de expresión génica se calcularon empleando el $-2\Delta\Delta Cq$ (Livak y Schmittgen, 2001). Para ello se utilizaron ciclos de cuantificación (Cq) del gen de mantenimiento β -actina para normalizar los valores de Cq del gen de interés, que se habían estandarizado para ensayos de densidad de población e hipoxia en juveniles de *C. gilberti* juveniles (Álvarez et al., 2020; Vega et al., 2024).

5.9 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se analizó con el programa informático R versión 3.5.2., comprobándose previamente la normalidad y homocedasticidad de todos los datos mediante las pruebas de Shapiro-wilk y Fligner-Killeen, respectivamente. La expresión de ARNm se sometió a un ANOVA unidireccional seguido de comparaciones de medias de Tukey. Las diferencias se

consideraron significativas cuando el valor de $P < 0,01$ (**) o $P < 0,05$ (*). Los resultados se representan gráficamente mediante GraphPad prism 8.1 como media \pm desviación estándar (SD) de las réplicas biológicas.

6. RESULTADOS

6.1 Caracterización y análisis comparativo de secuencias codificantes de leptina de *C. gilberti*

Los resultados de los alineamientos múltiples de secuencias de aminoácidos de *C. gilberti*, con respecto a los siguientes teleósteos: *Larimichthys crocea*, *Epinephelus coioides*, *Seriola lalandi*, *Micropterus salmoides*, *Lateolabrax japonicus*, *Scomber japonicus*, *Dicentrarchus labrax* y *Sparus aurata*, muestra el péptido señal (remarcado en celeste), y la secuencias de aminoácidos implicados en las cuatro hélices (A, B, C y D) que forman la estructura de la leptina. Además, de dos residuos de cisteína altamente conservados entre especies de peces, se muestran en color rojo.

Se identificó un clon de ADNc de longitud completa como CgLep (leptina de *C. gilberti*) de 486 pb con los marcos de lectura abiertos (ORF) completos, que codifica 161 aminoácidos. El peso molecular previsto de la proteína fue de 17,88 kDa y un punto isoelectrico teórico (pI) fue de 5,34. La secuencia putativa de la proteína contiene un péptido señal de 27 residuos (MDYSLALLFTILHLLSVGTAAPLSVEV).

La cgLep madura presenta las características cuatro α -hélices antiparalelas previamente observadas en las leptinas de peces. En particular, contiene dos residuos de cisteína altamente conservados (C111 y C161) que probablemente desempeñan una función estructural crucial al formar un puente disulfuro entre las hélices C y las hélices D (Figuras 8 y 9).



Figura 8. Modelización en silico de leptina de *C. gilberti*. Utilizando estructura cristalográfica de la leptina humana (PDB ID: d1ax8a) como templado con Hélice A en azul, la Hélice B en verde, Hélice C en amarillo limón y Hélice D en

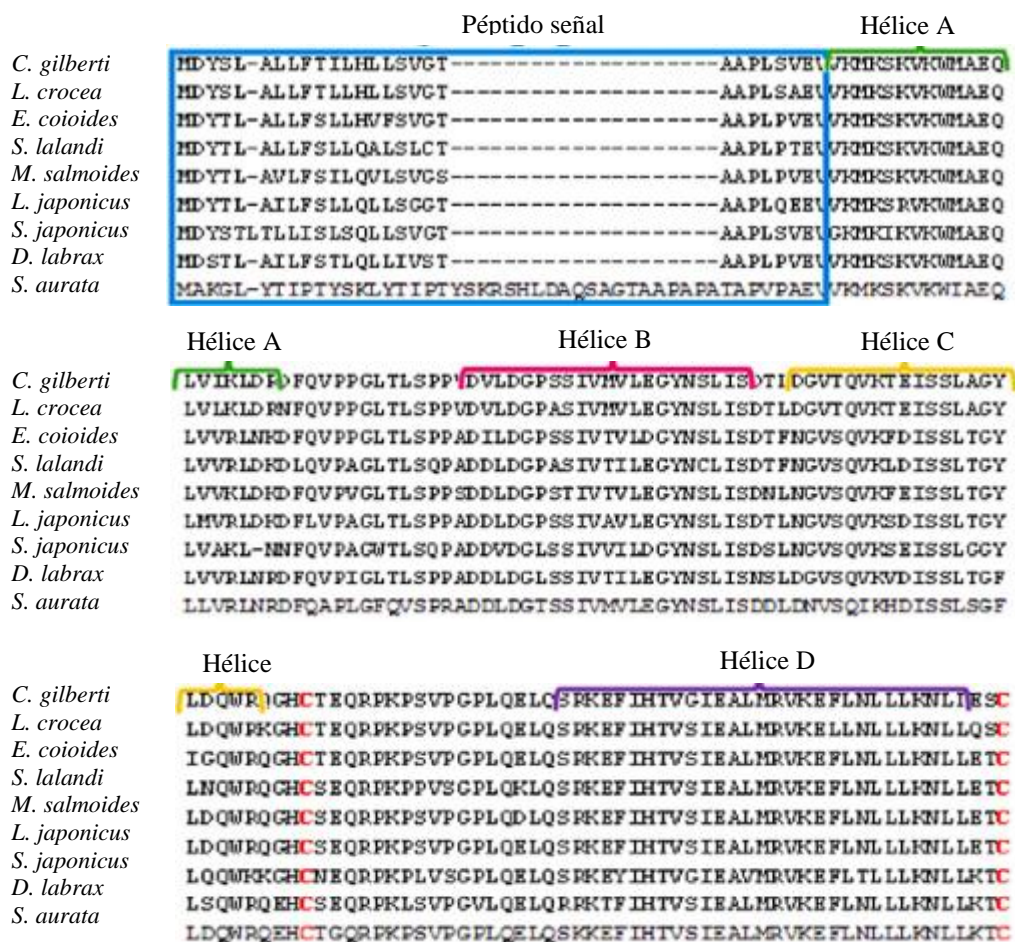


Figura 9. Alineamientos múltiples de secuencias de aminoácidos de leptina putativa de *C. gilberti* con especies homólogas de teleósteos.

En el recuadro celeste se remarca el péptido señal y las secuencias de aminoácidos implicadas en las cuatro hélices (A, B, C y D) que forman la estructura de la leptina. Además, se muestran dos residuos de cisteína altamente conservados entre las especies de peces.

Relativo al árbol filogenético de secuencias de aminoácidos de leptina, para la inferencia filogenética bayesiana utilizando el método Montecarlo basados en cadenas de Markov (MCMC) con modo de verosimilitud, de las especies: *Cilus gilberti*, *Larimichthys crocea*, *Larimichthys crocea*, *Epinephelus coioides*, *Seriola lalandi*, *Micropterus salmoides*, *Lateolabrax japonicus*, *Scomber japonicus*, *Dicentrarchus labrax* y *Sparus aurata*, se pudo establecer el porcentaje de réplicas del árbol en los que los taxones asociados se agruparon juntos en las 10.000 réplicas que se muestra junto a las ramas (Figura 10)

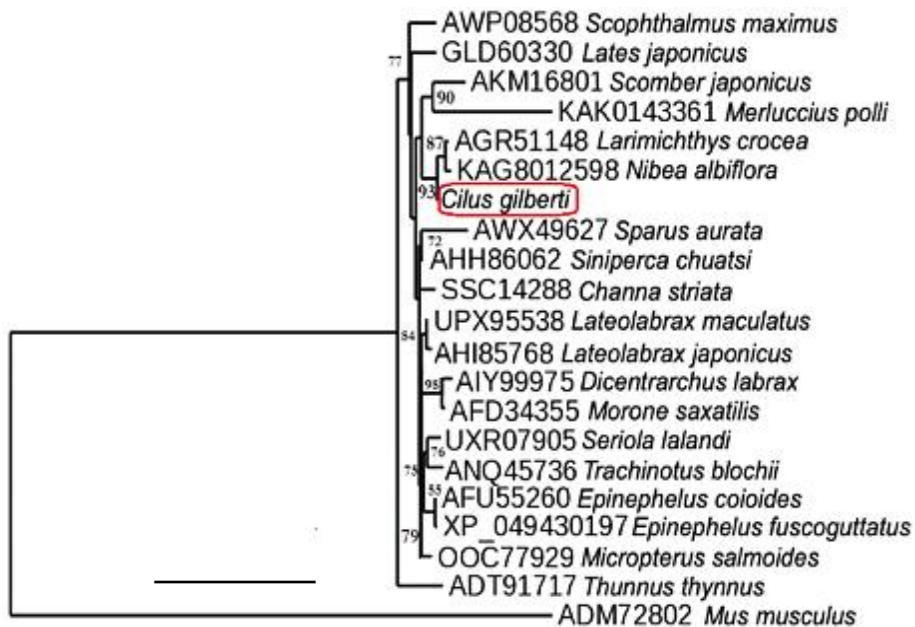


Figura 10. Árbol filogenético de secuencia de aminoácidos de leptina. Para la inferencia filogenética bayesiana utilizando métodos MCMC con modo de verosimilitud. El porcentaje del árbol replicados en los que los taxones asociados se agruparon en las 10.000 réplicas se muestra junto a las ramas. El árbol está dibujado a escala, con longitudes de las ramas en las mismas unidades que las de las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Cada rama contiene el número de acceso al GenBank correspondiente a las secuencias utilizadas.

6.2 Expresión basal de leptina y su receptor en tejidos de juveniles de *C. gilberti*

El análisis de los niveles transcripcionales basales de cgLep en juveniles de *C. gilberti* con una masa total media de 64,5 g, reveló una expresión relativa de su transcrito en hígado notablemente superior hasta 50 veces en comparación con otros tejidos ($p < 0,05$). Esta elevada expresión fue seguida de cerca por músculo blanco, mientras que niveles significativamente más bajos se observaron en el riñón anterior y posterior, cerebro bazo y branquias ($p < 0,05$). Por el contrario, los tejidos que mostraron una menor expresión de cgLep fueron ciegos pilóricos, estómago, intestino anterior y posterior (Figura 11).

En cuanto al receptor cgLepR, los niveles transcripcionales basales parecen notablemente superiores en músculo blanco, con niveles por arriba de 300 veces más altos que en otros tejidos

($p < 0,05$), y con niveles mucho más bajos a nivel de riñón anterior y posterior, así como a nivel hepático. Por el contrario, los niveles de expresión más bajos se observan en ciegos pilóricos, estómago e intestino anterior y posterior (Figura 12).

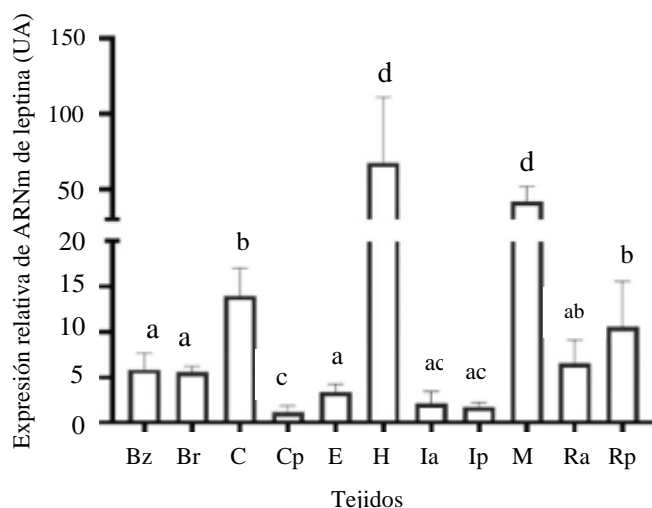


Figura 11. Expresión relativa de ARNm de leptina en tejidos de *C. gilberti*. Peces juveniles de un año en tejidos: Bazo (Bz), Branquias (Br), Cerebro (C), Ciegos pilóricos (Cp), Hígado (H), Intestino anterior (Ia), Intestino posterior (Ip), Músculo (M), Riñón anterior (Ra) y Riñón posterior (Rp). Los datos se presentan como expresión génica relativa, con β -actina como normalizador; y se enuncia la media \pm SD, cuyas diferencias significativas se consideraron cuando $P < 0,05$ y se indicaron con una letra diferente, $n = 6$.

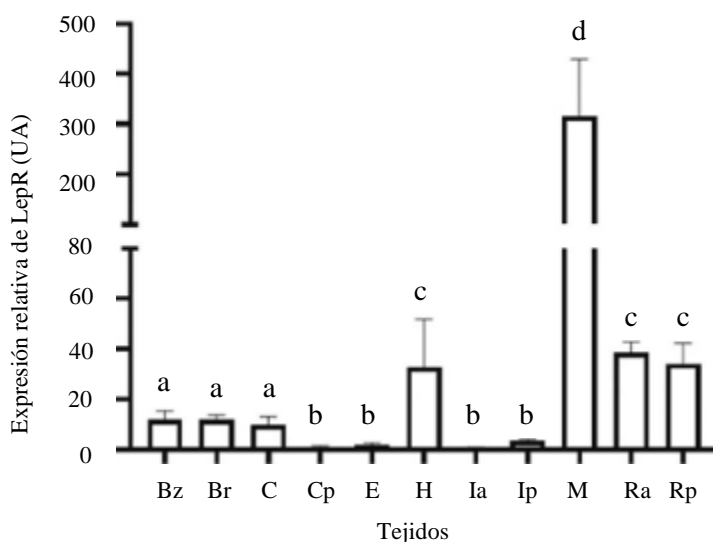


Figura 12. Expresión relativa de ARNm del receptor de leptina en tejidos de *C. gilberti*. Peces juveniles de un año, en tejidos: Bazo (Bz), Branquias (Br), Cerebro (C), Ciegos pilóricos (Cp), Hígado (H), Intestino anterior (Ia), Intestino posterior (Ip), Músculo (M), Riñón anterior (Ra) y Riñón posterior (Rp). Los datos se presentan como expresión génica relativa, con β -actina como normalizador; y se enuncia la media \pm SD, cuyas diferencias significativas se consideraron cuando $P < 0,05$ y se indicaron con una letra diferente, $n = 6$.

6.3 Efecto del estado de alimentación sobre la expresión génica de leptina y su receptor en juveniles de *C. gilberti*

De las muestras de tejido de juveniles de *C. gilberti* obtenidas durante los periodos pre y posprandiales, la expresión relativa de cgLep en hígado, y su receptor cgLepR tanto a nivel de cerebro y estomago; los resultados obtenidos indicaron valores bajos de cgLep durante el periodo preprandial, con un aumento significativo observado después de 1 h posprandial, seguido de un descenso 6 horas posprandial ($p < 0,05$) (Figura 13).

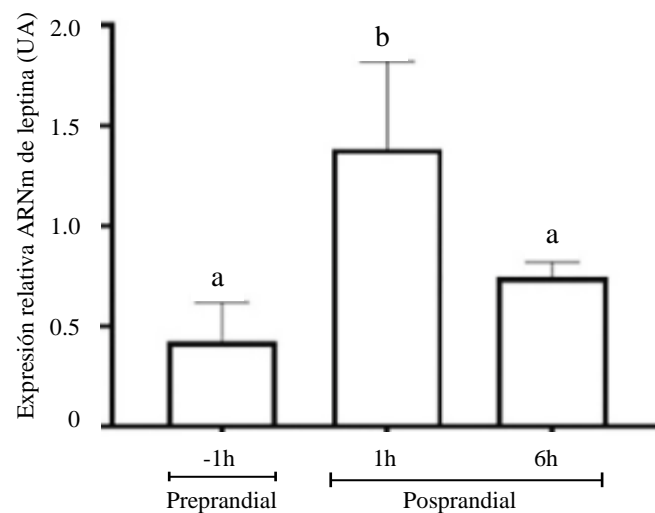


Figura 13. Expresión relativa de ARNm de leptina en hígado de *C. gilberti* en periodos preprandial y posprandial. 1 hora antes de alimentarse, y 1 hora y 6 horas después de alimentarse. Peces juveniles de un año. Se enuncia la media \pm SD, cuyas diferencias significativas se consideraron cuando $P < 0,05$ y se indicaron con una letra diferente, $n = 6$. ($n = 6$).

Comportamiento inverso se encontró en cgLepR a nivel cerebral, ya que mostró un aumento significativo de expresión relativa durante el periodo preprandial, con descensos notables y sostenidos observados 1 y 6 horas posprandiales. Sin embargo, no se observaron cambios en el nivel de expresión génica de cgLepR a nivel estomacal al comparar las condiciones preprandiales y posprandiales. Además, de manera general, los niveles de expresión génica en estómago fueron sistemáticamente inferiores a los detectados en cerebro ($p < 0,05$) (Figura 14).

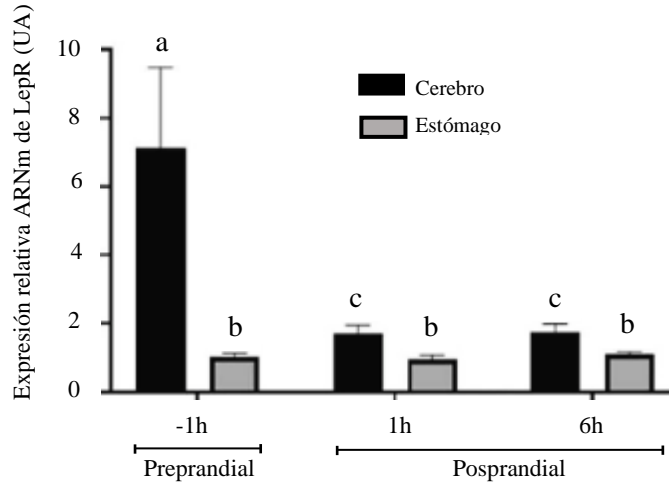


Figura 14. Expresión relativa de ARNm del receptor de leptina (LepR) en cerebro y estómago de *C. gilberti* en períodos preprandial y posprandial.

1 hora antes de alimentarse, y 1 hora y 6 horas después de alimentarse. Peces juveniles de un año. Se enuncia la media \pm SD, cuyas diferencias significativas se consideraron cuando $P < 0,05$ y se indicaron con una letra diferente, $n = 6$. ($n = 6$).

6.4 Efecto de la hipoxia aguda e intermitente sobre la expresión génica de leptina en juveniles de *C. gilberti*

Diversos factores ambientales ejercen notable influencia sobre la fisiología de los peces; en consecuencia, mediante este estudio se investigó el impacto de episodios agudos e intermitentes de bajos niveles de oxígeno disuelto (hipoxia) sobre leptina hepática en juveniles de *C. gilberti*. Los resultados mostraron un aumento significativo de los niveles de expresión del ARNm de la leptina durante las 2 primeras horas de exposición a hipoxia aguda (2 mg O₂/L) ($p < 0,05$), retornando a los niveles de expresión basales a las 6 horas tras la hipoxia (Figura 15). Por el contrario, los peces sometidos a un ciclo de 30 días de hipoxia diaria no mostraron disparidades significativas en los niveles de leptina hepática, en comparación a los peces mantenidos en condiciones normóxicas (7,6 mg O₂/L) (Figura 16).

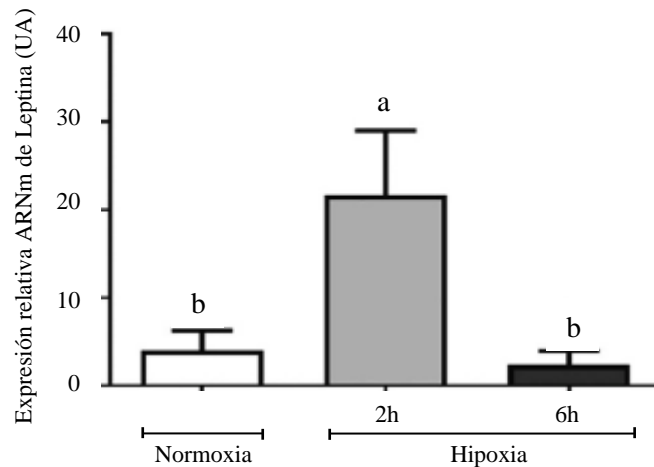


Figura 15. Expresión relativa de ARNm de leptina en hígado de *C. gilberti*, en normoxia (7,6 mg O₂/L) y después 2 h y 6 h de hipoxia aguda (2 mg O₂/L). Los datos se expresan como media ± SD, ya las diferencias significativas se consideraron cuando P < 0,05 y se indicaron con una letra diferente, n = 6.

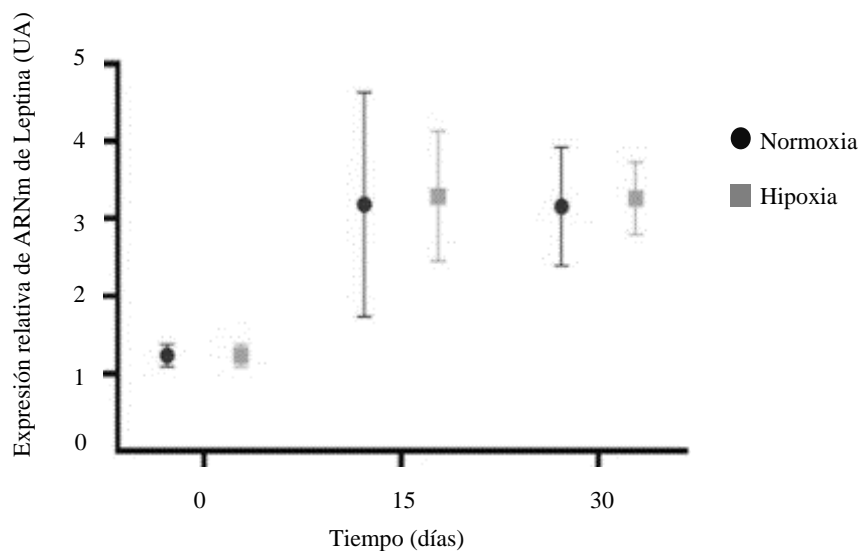


Figura 16. Expresión relativa de ARNm de leptina en hígado de *C. gilberti*, mantenidos en normoxia o hipoxia intermitente diaria. Los datos se expresan como media ± SD y las diferencias se consideraron significativas cuando P < 0,05, (n=6).

6.5 Efecto de la densidad de cultivo sobre la expresión génica de leptina en juveniles de *C. gilberti*

En la industria acuícola, la densidad de cultivo es un factor determinante para alcanzar niveles de productividad óptima, tomando en cuenta el bienestar de los organismos individuales, incluida la conservación de las señales de apetito a lo largo del cultivo. Este bioensayo con *C. gilberti*,

criados a distintas densidades de cultivo (15 kg/ m³; 25 kg/ m³ y 35 kg/ m³), arrojó resultados interesantes; en particular, en los tanques con la densidad más baja (15 Kg/m³), se observó una variabilidad individual en los niveles de expresión génica de la leptina hepática (cgLep). Esta variabilidad se manifestó ya que algunos individuos mostraron elevados niveles de expresión de cgLep hepática, mientras que otros mostraron niveles de expresión más bajos en el mismo tejido. En consecuencia, la media colectiva de expresión de leptina fue notablemente superior en los peces cultivados a 15 Kg/m³, comparados con los criados a densidades de 25 y 35 Kg/m³ (p<0,05) (Figura 17).

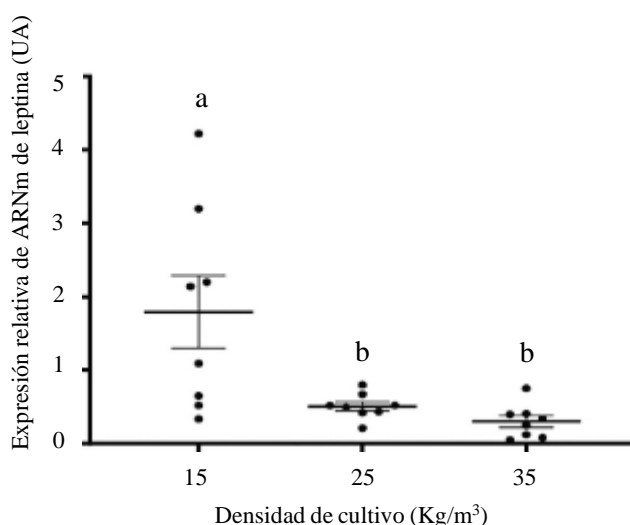


Fig.17 Expresión relativa de ARNm de leptina en hígado de *C. gilberti* a 15, 25 y 35 Kg/m³ densidades de cultivo. Los datos se expresan como media \pm SD y las diferencias se consideraron significativas cuando $P < 0,05$, (n=10).

7. DISCUSIÓN

7.1 Caracterización de secuencias codificantes de leptina de *C. gilberti*

Mediante la caracterización exhaustiva de la secuencia y la expresión transcripcional de la leptina, se pudo constatar que genéticamente existe similitud entre *C. gilberti* con respecto a otros teleósteos (*Larimichthys crocea*, *Epinephelus coioides*, *Seriola lalandi* *Micropterus salmoides*, *Lateolabrax japonicus*, *Scomber japonicus*, *Dicentrarchus labrax* y *Sparus aurata*), cuyas secuencias de aminoácidos muestra el péptido señal, manteniendo las cuatro hélices (A, B, C y D) que forman la estructura de la leptina, así mismo, disponen de dos residuos de cisteína altamente conservado (Figura 8 y 9). De forma análoga, en leptina de mamíferos, estos residuos de cisteína

establecen un puente disulfuro que conecta los extremos C-terminales de la hélice C y D (Denver et al., 2011; Wen et al., 2020).

El marco abierto de lectura (ORF, por sus siglas en inglés) presenta mayor similitud de secuencias de aminoácidos con miembros de la familia de la corvina, como la corvina amarilla grande, *Larimichthys crocea* (94,41 %). La similitud fue comprobada por análisis filogenético, donde se pudo verificar el agrupamiento de *C. gilberti* con corvina amarilla (*L. crocea*) y corvina amarilla (*Nibea albiflora*) en un solo clado, todas ellas pertenecientes a la familia Sciaenidae. De todas las especies incluidas en el análisis filogenético, sólo una, el atún rojo del Atlántico (*Thunnus thynnus*) se situó fuera del clado monofilético que contenía los otros ORF de leptina (Figura 10).

Este estudio se muestra la caracterización exhaustiva de la secuencia y la expresión transcripcional de la leptina en *C. gilberti*, hormona fundamental en la regulación de la ingesta de alimentos y el balance energético en vertebrados (Hussain y Khan, 2017). Mediante la disponibilidad de la secuencia de aminoácidos de cgLep, se pudo realizar un análisis de su estructura terciaria putativa, descubriendo una composición caracterizada por cuatro hélices. Cabe destacar, la conservación de dos residuos de cisteína, que desempeñan un papel fundamental en la estabilización de la estructura de la proteína. Esta conformación terciaria es vital, ya que facilita el reconocimiento de la leptina por su receptor asociado, desencadenando así la cascada de señalización celular, como se ha demostrado en vertebrados (Haglund et al., 2012 ; Liongue y Ward, 2007; Zabeau et al., 2005).

Sin embargo, en Lep-b del pez cebra se demostró la presencia de una tercera cisteína, a diferencia de lo que ocurre en otras especies como el salmón del Atlántico. Esta característica distintiva sugiere su especificidad para especies concretas (Gorissen et al., 2009; Kurokawa y Murashita, 2009; Rønnestad et al., 2010).

Por el momento, se desconoce si la existencia de la cisteína adicional podría afectar a la funcionalidad de la hormona, influyendo potencialmente en su interacción con el receptor (Gorissen et al., 2009). Por otra parte, el análisis filogenético corroboró el alto grado de conservación de la secuencia de aminoácidos de la leptina entre varias especies de peces marinos, como ha sido documentado en estudios previos, realizados en peces teleósteos (H. Zhao et al., 2015; Gorissen y Flik, 2014). Mientras que la leptina de peces conservan el par de residuos de cisteína que forman el puente disulfuro, es de destacar que carecen del motivo de seis residuos GLDFIP (posición 38-43 en la leptina humana) completamente conservado entre los tetrápodos y necesario para la activación del receptor de leptina (Denver et al., 2011), así mismo el autor

menciona que la ausencia de este motivo en los peces puede indicar un mecanismo diferente de unión y activación del receptor de leptina en estos vertebrados, en comparación con los tetrápodos.

7.2 Expresión basal de leptina y su receptor en tejidos de juveniles de *C. gilberti*

El análisis de los niveles transcripcionales basales de cgLep en juveniles de *C. gilberti*, reveló una expresión relativa de su transcrito a nivel hepático, y fue hasta 50 veces superior a los demás tejidos analizados ($p < 0,05$), seguida de cerca por el músculo blanco, y niveles significativamente más bajos en riñón anterior y posterior, cerebro, bazo y branquias ($p < 0,05$), y con menor expresión los ciegos pilóricos, estómago e intestino anterior y posterior (Figura 11).

Resultados similares se obtuvieron al analizar expresión de leptina en tejidos de peces de mayor tamaño de la misma especie, sometidos a condiciones de normoxia y en estudios de hipoxia intermitente (masa total media de 210 g), y con peso corporal medio de 358 g de una población, con una densidad de 25 Kg/m³. En ambos casos, la mayor expresión se observó a nivel de hígado, seguido del músculo (Álvarez et al., 2020).

Los resultados de este estudio sobre la expresión génica indican que los juveniles de un año mostraron mayor expresión relativa del transcrito cgLep a nivel de hígado, lo que concuerda con lo observado por Michel et al., (2016) en su investigación con pez cebra (*Danio rerio*), donde tanto la leptina como su receptor se expresaban predominantemente en el mismo órgano. Otros estudios con teleósteos, incluidos los de Tinoco et al., (2014); Gorissen y Flik, (2014); (Trombley et al., 2012), subrayan sobre los niveles de especialización del hígado en la producción de la hormona leptina. Sin embargo, a diferencia de los mamíferos, la expresión de leptina en el tejido adiposo de los peces teleósteos es mínima (Blanco y Soengas, 2021). Históricamente, se creía que estas células de peces no producían la hormona (Kurokawa y Murashita, 2009), aunque la investigación de Salmerón et al., (2015) realizadas con trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), demostraron que el tejido adiposo de los teleósteos tiene la capacidad de producir leptina, aunque a niveles más bajos en comparación con vertebrados superiores. Won et al., (2016) sugieren que, en teleósteos, la leptina se expresa principalmente en el hígado, ya que este tejido es responsable del almacenamiento de energía en los peces, que incluye lípidos, que cumplen una función similar a la de los depósitos de grasa de los mamíferos.

Notablemente, los niveles de expresión de la leptina en músculo son muy similares a los detectados en el hígado; además, los niveles de expresión basal del receptor, también se observaron en este tejido. Estos hallazgos sugieren que la leptina probablemente desempeña un papel importante en el equilibrio energético muscular de *C. gilberti*, ya que también se han observado patrones similares leptina en pez arroz japonés (*Oryzias latipes*), en los que se encontró una mayor expresión génica a nivel muscular (Kurokawa y Murashita, 2009).

Estudios realizados en ratones, han arrojado una luz sobre su posible papel del mecanismo de acción de la leptina en el metabolismo lipídico, ya que se ha demostrado que la leptina es capaz de promover la oxidación de los ácidos grasos, estimulando selectivamente la fosforilación y la activación de la subunidad catalítica $\alpha 2$ de la proteína quinasa activada por adenosín monofosfato AMP (AMPK) en músculo (Minokoshi y Kahn, 2003); sin embargo, es necesario seguir investigando para determinar si existen mecanismos similares en el metabolismo lipídico del músculo de *C. gilberti*.

Aunque el mecanismo regulador preciso de la expresión génica de la leptina sigue siendo difícil de obtener, se reconoce ampliamente que es una hormona fundamental que rige la homeostasis de la glucosa y los triacilglicéridos (TAG) (Yan, Chen, Chen, Tang, et al., 2016). También Zhang y Chua, (2018), afirma que las fluctuaciones en el estado nutricional provocan variaciones en la secreción de leptina, que sirve como señal crucial para la modulación de las reservas de triglicéridos, incluso en especies no mamíferas.

En cuanto a su receptor, cgLepR, los niveles transcripcionales basales aparecen notablemente más elevados en músculo blanco, con niveles medios arriba de 300 veces superiores a los de otros tejidos ($p < 0,05$), luego, en un nivel mucho más bajo de expresión génica en riñón anterior y posterior, así como a nivel hepático. Por el contrario, los niveles de expresión más bajos se observan en ciegos pilóricos, estómago e intestino anterior y posterior, (Figura 12).

La mayor expresión de receptores de leptina en este tejido apunta a un posible papel regulador en el almacenamiento de grasa muscular, no obstante, es indispensable seguir investigando para el medir impacto de la leptina en el metabolismo lipídico del músculo de *C. gilberti*. Estos hallazgos implican una función conservada de la leptina en todos los teleósteos, centrada principalmente en la movilización de moléculas energéticas (Chen et al., 2020). Además, es probable que la leptina influya en la ingesta de alimentos y la regulación del peso corporal, así como en la adaptación a niveles bajos de oxígeno, en entornos acuáticos (Gorissen y Flik, 2014).

7.3 Efecto del estado de alimentación en la expresión de leptina y su receptor en juveniles de *C. gilberti*

Debido al impacto directo del estado energético de los animales sobre los niveles de leptina, este estudio analizó la expresión génica durante los periodos preprandial y posprandial. Para confirmar las condiciones de ayuno y pos-alimentación de los peces, se evaluó la expresión relativa de cgLep en hígado, y su receptor cgLepR en cerebro y estómago. Los resultados indicaron valores bajos de cgLep durante el periodo preprandial, con un aumento significativo observado después de 1 hora posprandial, seguido de un descenso 6 horas posprandiales ($p < 0,05$), (Figura 13). Por el contrario, cgLepR a nivel cerebral, mostró un aumento significativo durante el periodo preprandial, con descensos notables y sostenidos observados en 1 y 6 horas posprandiales; sin embargo, no se observaron cambios a nivel de expresión génica de cgLepR a nivel del estómago, al comparar los estados preprandiales y posprandiales. Además, los niveles de expresión fueron sistemáticamente inferiores a los detectados en el cerebro ($p < 0,05$) (Figura 14).

Los ritmos de alimentación desempeñan un papel crucial en el metabolismo de los peces, orquestando reguladores endocrinos de crecimiento y apetito; sin embargo, el patrón circadiano de la leptina en este proceso sigue sin explorarse teleósteos. Los resultados de esta investigación, indican un rápido aumento de los niveles de leptina después de la alimentación, seguido de un retorno a valores cercanos al ayuno después de la digestión (Huisin et al., 2006).

La participación crucial de la leptina en la regulación del gasto energético en los peces, responde a una variedad de estresores, ya que a menudo los peces recurren a la reducción de la ingesta de alimentos como mecanismo de adaptación ante estresores recurrentes (Mankiewicz et al., 2021); Parker y Cheung, 2020). Entre estos factores de estrés, la hipoxia surge como una amenaza crítica, derivada de la saturación inadecuada de oxígeno en los entornos acuáticos, especialmente en los sistemas de acuicultura intensiva. Por lo tanto, es razonable inferir ya que las hormonas que rigen la ingesta de alimentos podrían sufrir alteraciones bajo tales circunstancias ambientales (Conde-Sieira y Soengas, 2017; Salmerón et al., 2015).

7.4 Efecto de la hipoxia aguda e intermitente sobre la expresión génica de leptina en juveniles de *C. gilberti*

Diversos factores ambientales ejercen notables influencias en la fisiología de los peces, lo que motiva a realizar este estudio, investigando el impacto de los episodios agudos e intermitentes de niveles bajos de oxígeno disuelto (OD) en la expresión de leptina hepática en juveniles de *C. gilberti*. Los resultados de esta investigación mostraron un aumento significativo de los niveles de expresión del ARNm de leptina durante las dos primeras horas de exposición a hipoxia aguda ($p < 0,05$), seguida de un retorno a los niveles de expresión basales a las 6 horas después de la hipoxia (Figura 15).

Por el contrario, los peces sometidos a un ciclo de 30 días de hipoxia diaria no mostraron diferencias significativas en los niveles de leptina hepática, en comparación con los mantenidos en condiciones de normoxia (Figura 16).

Los resultados de este estudio mostraron un rápido aumento en los niveles de leptina a las 2 horas de exposición a hipoxia aguda (2 mg O₂/L), seguida de un retorno a los niveles de normoxia después de 6 horas, y esta respuesta fue persistente con exposiciones continuas de la hipoxia a largo plazo; ya que en hipoxia intermitente, los peces sometidos a 30 días en las mismas condiciones hipóxicas, mostraron niveles de leptina en hígado similares a los de los individuos mantenidos en condiciones normoxicas; lo que sugiere que esta especie posee adaptaciones fisiológicas que le permiten responder eficazmente cuando los niveles de oxígeno disminuyen en el agua de mar (Álvarez et al., 2020).

Debido a su asociación directa con el metabolismo anaeróbico, la hipoxia induce a los organismos a recurrir a la glucólisis anaeróbica para satisfacer las mayores demandas de energía durante el estrés inducido por la hipoxia (Carmo et al., 2020). Además, algunos estudios proponen que la leptina, junto con los glucocorticoides, puede servir como señal catabólica durante situaciones de estrés; se cree que esta señal facilita la movilización de recursos energéticos, ayudando así a los organismos a hacer frente a la mayor demanda de energía provocada por el estrés (Parker y Cheung., 2020); Deck et al., 2017). Sin embargo, en especies más susceptibles a la hipoxia, la regulación de la leptina puede diferir notablemente; por ejemplo, estudios con truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) expuestas a condiciones adversas hipóxicas e hiperóxicas, impactan en el aumento de peso, las tasas de supervivencia y la conversión alimenticia, potencialmente con los niveles de expresión de leptina hepática (Aksakal y Ekinci, 2021); Assan,

Huang, et al., 2021). En general, la regulación del apetito en ambientes hipóxicos es específica de cada especie y depende del ciclo vital de los peces.

7.5 Efecto de la densidad de cultivo sobre la expresión génica de leptina en juveniles de *C. gilberti*

Las distintas densidades de cultivo, investigadas en este estudio con corvina *Cilus gilberti*, arrojó importantes resultados ; en particular, la densidad más baja (15 Kg/m³), en la cual se observó una variabilidad individual en los niveles de expresión génica, donde algunos individuos presentaron elevados niveles de expresión génica de cgLep, mientras que otros mostraron niveles más bajos a nivel hepático, de manera que la media de expresión génica de leptina fue superior en los peces cultivados a 15 Kg/m³, con respecto a los criados a densidades de 25 y 35 Kg/m³ (p<0,05) (Figura 17). Esta dicotomía dio lugar a una amplia dispersión de los datos de expresión génica de los peces de estos tanques.

Basado en estos hallazgos, se puede afirmar que la densidad de población es otro factor importante que puede provocar respuestas de estrés en granjas piscícolas, ya que puede influir en el crecimiento, el bienestar y el comportamiento dentro de las jaulas, tomando en cuenta que, en acuicultura, garantizar el bienestar de los peces es primordial para mejorar las tasas de crecimiento (Zhang et al., 2022). También se puede sugerir sobre la presencia de un comportamiento jerárquico a densidades de cultivo más bajas (Carbonara et al., 2019).

Las respuestas al estrés pueden variar entre individuos, y las reacciones fisiológicas podrían estar ligadas a condiciones ambientales distintas (Øverli et al., 2007). Resultados similares en estudios previos fueron obtenidos por (Álvarez et al., 2020), donde juveniles de *C. gilberti* toleraron altas densidades de población (35 kg/m³) sin experimentar estrés crónico y mostraron una respuesta favorable a la hipoxia aguda, sin comprometer el crecimiento. Sin embargo, es necesario reconocer que estos comportamientos son específicos de cada especie, por ejemplo, en salmón del atlántico (*Salmo salar*), se observó un efecto contrario, en el que las altas densidades de población (superiores a 20 kg/m³) desencadenaron la síntesis de moléculas asociadas a la inhibición del apetito, como la leptina (Álvarez et al., 2022), fenómeno que podría atribuirse a la regulación de las señales de inhibición de la ingesta dentro del sistema nervioso central. Varios estudios indican que la leptina desempeña un papel en la modulación de procesos neuroendocrinos relacionados con las respuestas adaptativas y el comportamiento (Copeland et al., 2011); Gorissen y Flik, 2014). Por

lo tanto, el mantenimiento de los peces en densidades de cultivo estandarizadas puede conducir a una mayor productividad, correlacionada con un mejor consumo de alimentos.

8. CONCLUSIONES

El análisis de las secuencias de aminoácidos de la leptina en *C. gilberti* (cgLep) ha revelado un alto grado de conservación tanto en su secuencia como en su estructura, cuando se compara con homólogos de otras especies de peces teleósteos. Además, cgLep se expresa predominantemente en los tejidos hepáticos y musculares de los juveniles de *C. gilberti*.

Por otra parte, se ha observado que la expresión del gen cgLep aumenta en respuesta al balance energético posprandial y en entornos con densidades de población inferiores a 25 kg/m³. Este último hallazgo es particularmente importante, ya que sugiere posibles alteraciones en el comportamiento alimentario debido a señales de saciedad aumentadas como resultado de cambios en el comportamiento de los peces.

Además, los análisis de la expresión de cgLep en condiciones de hipoxia demuestran considerable resiliencia de esta especie en entornos con baja disponibilidad de oxígeno disuelto. En conclusión, la regulación al alza de cgLep hepática se produce sólo durante episodios agudos de hipoxia, volviendo rápidamente a los niveles basales cuando se restablecen las condiciones normóxicas.

9. REFERENCIAS

- Aksakal, E., Ekinçi, D., 2021. Effects of hypoxia and hyperoxia on growth parameters and transcription levels of growth, immune system and stress related genes in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol. -Part A: Mol. Integr. Physiol.* 262 <https://doi.org/0.1016/j.cbpa.2021.111060>.
- Alvarez, ´ C.A., Alvarado, J.F., Farías, M., C´ arcamo, C.B., Flores, H., Guzm´ an, F., Martín, S. S., Varas, J., Messina, S., Acosta, F., Sandoval, N., Vega, B., Santana, P.A., 2023. First insights about orexigenic activity and gastrointestinal tissue localization of ghrelin from Corvina drum (*Cilus gilberti*). *Aquaculture* 571, 739468. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739468>.
- Alvarez, ´ C.A., Jerez-Cepa, I., C´ arcamo, C.B., Toledo, P., Flores, H., Brokordt, K., 2020. Growth performance, physiological responses to hypoxia and flesh quality of Chilean croaker (*Cilus gilberti*) stocked at different densities. *Aquaculture* 525 (November 2019), 735316. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735316>.
- Alvarez, ´ C.A., Santana, P.A., Carcamo, ´ C.B., Cardenas, ´ C., Morales-Lange, B., Ramírez, F., Valenzuela, C., Boltana, ~ S., Alcaíno, J., Guzm´ an, F., Mercado, L., 2022. Effect of fish

- stock density on hormone genes expression from brain and gastrointestinal tract of salmo salar. *Animals* 12 (9). <https://doi.org/10.3390/ani12091174>.
- Assan, D., Huang, Y., Mustapha, U.F., Addah, M.N., Li, G., Chen, H., 2021. Fish feed intake, feeding behavior, and the physiological response of apelin to fasting and refeeding. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 12, 1676. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2021.798903/BIBTEX>.
- Bernier, N.J., Gorissen, M., Flik, G., 2012. Differential effects of chronic hypoxia and feed restriction on the expression of leptin and its receptor, food intake regulation and the endocrine stress response in common carp. *J. Exp. Biol.* 215 (13), 2273–2282. <https://doi.org/10.1242/jeb.066183>.
- Blanco, A.M., Soengas, J.L., 2021. Leptin signalling in teleost fish with emphasis in food intake regulation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 526 <https://doi.org/10.1016/j.mce.2021.111209>.
- Carbonara, P., Dioguardi, M., Cammarata, M., Zupa, W., Vazzana, M., Spedicato, M.T., Lembo, G., 2019. Basic knowledge of social hierarchies and physiological profile of reared sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *PLoS ONE* 14 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208688>.
- Carmo Neves, L., Favero, G.C., Beier, S.L., Ferreira, N.S., Palheta, G.D.A., de Melo, N.F.A. C., Luz, R.K., 2020. Physiological and metabolic responses in juvenile *Colossoma macropomum* exposed to hypoxia. *Fish. Physiol. Biochem.* 46, 2157–2167. <https://doi.org/10.1007/S10695020-00868-8/METRICS>.
- Chen, H., Wang, B., Zhou, B., Qi, J., Tang, N., Wang, S., Tian, Z., Wang, M., Xu, S., Yu, N., Chen, D., Dawood, M.A.O., Li, Z., 2020. Characterization, phylogeny, and responses of leptin to different nutritional states in critically endangered Yangtze sturgeon (*Acipenser dabryanus*). *Aquaculture* 525. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735296>.
- Conde-sieira, M., Soengas, J.L., 2017. Conde-sieira, M., & Soengas, J.L., 2017. Nutrient Sensing Systems in Fish: Impact on Food Intake Regulation and Energy Homeostasis. 10(January), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00603>.
- Conde-Sieira, M., Chivite, M., Míguez, J.M., Soengas, J.L., 2018. Stress effects on the mechanisms regulating appetite in teleost fish. *Front. Endocrinol.* 9 (OCT), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00631>.
- Copeland, D.L., Duff, R.J., Liu, Q., Prokop, J., Londraville, R.L., 2011. Leptin in teleost fishes: An argument for comparative study. *Front. Physiol.* JUN <https://doi.org/10.3389/fphys.2011.00026>.
- Deck, C.A., Honeycutt, J.L., Cheung, E., Reynolds, H.M., Borski, R.J., 2017. Assessing the functional role of leptin in energy homeostasis and the stress response in vertebrates. *Front. Endocrinol.* 8 (APR) <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00063>.
- Denver, R.J., Bonett, R.M., Boorse, G.C., 2011. Evolution of leptin structure and function. *Neuroendocrinology* 94 (1), 21–38. <https://doi.org/10.1159/000328435>.
- Friedman, J., 2015. Leptin and the regulation of food intake and body weight. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 61, S202. <https://doi.org/10.3177/jnsv.61.S202>.
- Gong, N., Lundin, J., Morgenroth, D., Sheridan, M.A., Sandblom, E., Bjornsson, B.T., 2022. Roles of leptin in initiation of acquired growth hormone resistance and control of metabolism in rainbow trout. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 322 (5), R434–R444. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00254.2021>.
- Gorissen, M., Bernier, N.J., Nabuurs, S.B., Flik, G., Huising, M.O., 2009. Two different leptin paralogues in zebrafish (*Danio rerio*) that originate early in teleostean evolution. *J. Endocrinol.* 201 (3), 329–339. <https://doi.org/10.1677/JOE-09-0034>.

- Gorissen, M., Flik, G., 2014. Leptin in teleostean fish, towards the origins of leptin physiology. *J. Chem. Neuroanat.* 61–62, 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2014.06.005>.
- Haglund, E., Su/kowska, J.I., He, Z., Feng, G.S., Jennings, P.A., Onuchic, J.N., 2012. The unique cysteine knot regulates the pleiotropic hormone leptin. *PLoS One* 7 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045654>.
- Hou, Z.S., Wen, H.S., 2021. Neuropeptide Y and melanocortin receptors in fish: regulators of energy homeostasis. *Mar. life Sci. Technol.* 4, 42–51. <https://doi.org/10.1007/S42995-021-00106-X>.
- Hsuchou, H., He, Y., Kastin, A.J., Tu, H., Markadakis, E.N., Rogers, R.C., Fossier, P.B., Pan, W., 2009. Obesity induces functional astrocytic leptin receptors in hypothalamus. *Brain* 132 (4), 889–902. <https://doi.org/10.1093/brain/awp029>.
- Huising, M.O., Geven, E.J.W., Kruiswijk, C.P., Nabuurs, S.B., Stolte, E.H., Spanings, F.A. T., Lidy Verburg-Van Kemenade, B.M., Flik, G., 2006. Increased leptin expression in common carp (*Cyprinus carpio*) after food intake but not after fasting or feeding to satiation. *Endocrinology* 147 (12), 5786–5797. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0824>.
- Hussain, Z., Khan, J.A., 2017. Food intake regulation by leptin: Mechanisms mediating gluconeogenesis and energy expenditure. In: *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, Vol. 10. Wolters Kluwer Medknow Publications, pp. 940–944. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.09.003>.
- Hyeong-Kyu, Park¹, Rexford, S.Ahima, 2014. *Leptin Signal.* 81 (September), 223–241. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.02.014>.
- Kurokawa, T., Murashita, K., 2009. Genomic characterization of multiple leptin genes and a leptin receptor gene in the Japanese medaka, *Oryzias latipes*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 161 (2), 229–237. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.01.008>.
- Liongue, C., Ward, A.C., 2007. Evolution of Class I cytokine receptors. *BMC Evolut. Biol.* 7 <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-120>.
- Mankiewicz, J.L., Deck, C.A., Taylor, J.D., Douros, J.D., Borski, R.J., 2021. Epinephrine and glucose regulation of leptin synthesis and secretion in a teleost fish, the tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 302 <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113669>.
- Mcclelland, G., Zwingelstein, G., Weber, J.-M., Brichon, G., 1995. Lipid composition of tissue and plasma in two mediterranean fishes, the gilt-head sea bream (*Chrysophrys auratus*) and the European seabass (*Dicentrarchus labrax*). www.nrcresearchpress.com.
- Michel, M., Page-McCaw, P.S., Chen, W., Cone, R.D., 2016. Leptin signaling regulates glucose homeostasis, but not adipostasis, in the zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113 (11), 3084–3089. <https://doi.org/10.1073/pnas.1513212113>.
- Minokoshi, Y., Kahn, B.B., 2003. Role of AMP-activated protein kinase in leptin-induced fatty acid oxidation in muscle. *Biochem. Soc. Trans.* 31 (1), 196–201. <https://doi.org/10.1042/bst0310196>.
- Øverli, Ø., Sørensen, C., Pulman, K.G.T., Pottinger, T.G., Korzan, W., Summers, C.H., Nilsson, G.E., 2007. Evolutionary background for stress-coping styles: Relationships between physiological, behavioral, and cognitive traits in non-mammalian vertebrates. *Neurosci. Biobehav. Rev.* Vol. 31 (Issue 3), 396–412. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2006.10.006>.
- Parker, C.G., Cheung, E., 2020. Metabolic control of teleost reproduction by leptin and its complements: understanding current insights from mammals. *Gen. Comp. Endocrinol.* 292, 113467 <https://doi.org/10.1016/J.YGCEN.2020.113467>.
- Pollock, M.S., Clarke, L.M.J., Dubé, M.G., 2007. The effects of hypoxia on fishes: From ecological relevance to physiological effects. *Environ. Rev.* 15, 1–14. <https://doi.org/10.1139/a06-006>.

- Prokop, J.W., Duff, R.J., Ball, H.C., Copeland, D.L., Londraville, R.L., 2012. Leptin and leptin receptor: analysis of a structure to function relationship in interaction and evolution from humans to fish. *Peptides* 38 (2), 326–336. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.10.002>.
- Rønnestad, I., Gomes, A.S., Murashita, K., Angotzi, R., Jonsson, E., Volkoff, H., 2017. Appetite-controlling endocrine systems in teleosts. *Front. Endocrinol.* 8 (APR), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00073>.
- Rønnestad, I., Nilsen, T.O., Murashita, K., Angotzi, A.R., Gamst Moen, A.G., Stefansson, S.O., Kling, P., Thrandur Bjornsson, B., Kurokawa, T., 2010. Leptin and leptin receptor genes in Atlantic salmon: cloning, phylogeny, tissue distribution and expression correlated to long-term feeding status. *Gen. Comp. Endocrinol.* 168 (1), 55–70. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.04.010>
- Salmeron, C., Johansson, M., Angotzi, A.R., Rønnestad, I., Jonsson, E., Bjornsson, B.T., Gutierrez, J., Navarro, I., Capilla, E., 2015. Effects of nutritional status on plasma leptin levels and in vitro regulation of adipocyte leptin expression and secretion in rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* 210, 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.10.016>.
- Shaikh, S.R., Shaver, P.R., Shewchuk, B.M., 2018. High Fat Diet Dysregulates Hypothalamic-Pituitary Axis Gene Expression Levels which are Differentially Rescued by EPA and DHA Ethyl Esters. *Mol. Nutr. Food Res.* 62 (13), 1–28. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201800219>.
- Sun, P., Bao, P., Tang, B., 2017. Transcriptome analysis and discovery of genes involved in immune pathways in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) under high stocking density stress. *Fish. Shellfish Immunol.* 68, 332–340. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.07.013>.
- Tinoco, A.B., Nisembaum, L.G., de Pedro, N., Delgado, M.J., Isorna, E., 2014. Leptin expression is rhythmic in brain and liver of goldfish (*Carassius auratus*). Role of feeding time. *Gen. Comp. Endocrinol.* 204, 239–247. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.06.006>.
- Trombley, S., Maugars, G., Kling, P., Bjornsson, B.T., Schmitz, M., 2012. Effects of longterm restricted feeding on plasma leptin, hepatic leptin expression and leptin receptor expression in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 175 (1), 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.10.001>.
- Vega, B., Toro-Araneda, T., Alvarado, J.F., Carcamo, C.B., Guzman, F., Acosta, F., Oliva, M., Serrano, E., Galarza, I.J., Alvarez, C.A., 2014. Effects of hypoxia on the antibacterial activity of epidermal mucus from chilean meagre (*Cilus gilberti*). *Animals* 14 (13). <https://doi.org/10.3390/ani14132014>.
- Vissers, M., Gorissen, M., Flick, G., Huising, M.O., 2013. Leptin in Teleost Fish. *Radboud Repos. January 2018, 144.* <http://repository.ubn.ru.nl/bitstream/handle/2066/93611/93611.pdf?sequence=1>.
- Volkoff, H., Canosa, L.F., Unniappan, S., Cerda-Reverter, J.M., Bernier, N.J., Kelly, S.P., Peter, R.E., 2005. Neuropeptides and the control of food intake in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142 (1-2 SPEC. ISS.), 3–19. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2004.11.001>.
- Wen, Z.Y., Qin, C.J., Wang, J., He, Y., Li, H.T., Li, R., Wang, X.D., 2020. Molecular characterization of two leptin genes and their transcriptional changes in response to fasting and refeeding in Northern snakehead (*Channa argus*). *Gene* 736. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144420>.
- Won, E.T., Baltzegar, D.A., Picha, M.E., Borski, R.J., 2012. Cloning and characterization of leptin in a Perciform fish, the striped bass (*Morone saxatilis*): Control of feeding and regulation by nutritional state. *Gen. Comp. Endocrinol.* 178 (1), 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.04.019>.

- Won, E.T., Douros, J.D., Hurt, D.A., Borski, R.J., 2016. *Leptin stimulates hepatic growth hormone receptor and insulin-like growth factor gene expression in a teleost fish, the hybrid striped bass*.
- Wu, L., Li, H., Xu, W., Dong, B., Jin, J., Han, D., Zhu, X., Yang, Y., Liu, H., Xie, S., 2021. Dissimilar regulation of glucose and lipid metabolism by leptin in two strains of gibel carp (*Carassius gibelio*). *Br. J. Nutr.* *125* (11), 1215–1229. <https://doi.org/10.1017/S0007114520003608>.
- Yan, A.F., Chen, T., Chen, S., Tang, D.S., Liu, F., Jiang, X., Huang, W., Ren, C.H., Hu, C. Q., 2016. Signal transduction mechanism for glucagon-induced leptin gene expression in goldfish liver. *Int. J. Biol. Sci.* *12* (12), 1544–1554. <https://doi.org/10.7150/ijbs.16612>.
- Yuan, X.C., Liang, X.F., Cai, W.J., Li, A.X., Huang, D., He, S., 2020. Differential roles of two leptin gene paralogues on food intake and hepatic metabolism regulation in mandarin fish. *Front. Endocrinol.* *11* <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00438>.
- Zhang, Y., Chua, S., 2018. Leptin function and regulation. *Compr. Physiol.* *8* (1), 351–369. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160041>.
- Zhang, Z., Fu, Y., Zhao, H., Zhang, X., 2022. Social enrichment affects fish growth and aggression depending on fish species: applications for aquaculture. *Front. Mar. Sci.* *9* <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.1011780>.
- Zhao, H., Zeng, C., Yi, S., Wan, S., Chen, B., Gao, Z., 2015. Leptin genes in blunt snout bream: cloning, phylogeny and expression correlated to gonads development. *Int. J. Mol. Sci.* *16* (11), 27609–27624. <https://doi.org/10.3390/ijms161126044>.

**10. CAPÍTULO II: CARACTERIZACION Y PERFILES DE EXPRESIÓN
GÉNICA DE GRELINA EN CORVINA (*Cilus giberti*, Abbott 1899), EN
RESPUESTA A HIPOXIA Y PERIODOS DE ALIMENTACIÓN**

Re-editado a partir de:

Claudio A. Álvarez; Juan F. Alvarado. 2023. First insights about orexigenic activity and gastrointestinal tissue localization of ghrelin from Corvina drum (*Cilus gilberti*). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739468>.

Claudio A. Álvarez; Juan F. Alvarado Juan F. 2023. Primeros conocimientos sobre la actividad orexigénica y la localización en tejido gastrointestinal de la grelina de Corvina tambor (*Cilus gilberti*). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739468>

10.1 Resumen

La corvina *Cilus gilberti* comúnmente conocida como corvina tambor, es considerada una especie marina de interés para la diversificación de la acuicultura chilena. Para optimizar las condiciones de cultivo, se han examinado los marcadores moleculares que regulan el apetito, siendo uno de ellos la grelina, péptido gastrointestinal, que desempeña un papel estimulante en la ingesta de alimentos en mamíferos y peces teleósteos. No obstante, aunque el sistema de control del apetito se considera relativamente bien conservado entre los vertebrados, la bioactividad de estas moléculas debe analizarse en cada especie de pez.

Por lo tanto, este estudio tuvo como objetivo investigar la expresión y la capacidad orexigénica de la grelina de *C. gilberti*, después de períodos pre y posprandial, analizando la expresión de ARNm de grelina en estómago en juveniles de dicha especie. Los resultados mostraron que el estómago tiene mayor expresión de ARNm de grelina, y que sus niveles aumentaron en periodo preprandial y disminuían después del mismo, mientras que la expresión de ARNm del receptor secretagogo de la hormona del crecimiento (GHS-R), también conocido como receptor de grelina, en los órganos gastrointestinales, lo que respalda la idea de la regulación orexigénica periférica en estos tejidos. En conclusión, los resultados sugieren que la grelina de *C. gilberti* conserva la capacidad orexigénica descrita en otros peces teleósteos, con una función reguladora en el tracto gastrointestinal (TGI) de dicha especie.

Este es el primer informe de un pequeño péptido orexígeno en los tejidos digestivos de un esciéntido sudamericano. Aunque la grelina es un marcador molecular promisorio para el análisis del consumo de alimento en el cultivo de *C. gilberti*, se necesitan más investigaciones para seguir evaluando los efectos de las prácticas acuícolas sobre el marcador periférico del apetito.

10.2 Introducción

En todos los organismos, la energía para la supervivencia se proporciona mediante la ingesta y absorción de alimentos. Por lo tanto, el crecimiento de los animales depende de su capacidad de ingerir, digerir y asimilar los nutrientes de la dieta. En la acuicultura de peces, el coste de los piensos representa la mayor parte del coste total durante el periodo de producción, entre el 30 y el 60% del mismo. período de producción, entre el 30 y el 60% del mismo (Luna et al., 2019). Por lo tanto, minimizar las pérdidas durante la ingesta de alimento desempeña un papel importante en el éxito de la acuicultura, en búsqueda de la sostenibilidad económica basada en una mayor eficiencia

de la producción. En consecuencia, como resultado del conocimiento sobre las necesidades de nutrientes, los ingredientes eficaces de los piensos, los aditivos y la importancia de las nuevas prácticas en el manejo de la alimentación, son muy importantes para los productores.

Dentro de las prácticas de gestión de la alimentación, la identificación de marcadores moleculares asociados a señales de alimentación en especies acuícolas es esencial para el manejo de los periodos de alimentación, fotoperíodo y la evaluación de dietas específicas para cada especie. En los peces, como en los mamíferos, los sistemas neuronales implicados en la regulación están interconectados morfológica y funcionalmente, formando una red, que va desde las señales cerebrales del apetito en el hipotálamo hasta las señales periféricas de los tejidos gastrointestinales, incorporando el estado energético y las señales de hambre/saciedad (Rønnestad et al., 2017).

Muchas moléculas de este proceso, identificadas por primera vez en vertebrados superiores, también se han descrito en peces teleósteos, los neuropéptidos orexigénicos, neuropéptido Y, y la β -endorfina, que actúan probablemente en áreas cerebrales asociadas con el aumento de la regulación del apetito (Lin et al., 2000; Volkoff, 2016). Además, los péptidos orexigénicos/anorexigénicos del tracto gastrointestinal (TGI) participan en el control periférico de la de la ingesta y la señalización GIT-cerebro asociada a la disminución o el aumento del apetito Tinoco et al., (2014) ; Unniappan et al., 2004; Unniappan y Peter, 2005; Volkoff et al., 2005). También los autores plantean que una descripción adecuada de la actividad y función de estas moléculas en los peces debe analizarse para cada especie de pez. Varios reportes describen que el péptido GIT grelina desempeña un papel estimulante orexigénico en la ingesta de alimentos en mamíferos y peces teleósteos.

En los peces teleósteos, la mayor evidencia de la función de los péptidos GIT se basa en la inyección directa de péptidos en los peces y el análisis de la cantidad de alimento ingerido. Sin embargo, diferentes autores describen propiedades orexigénicas o anorexigénicas para el mismo péptido (Jonsson et al., 2010; Tinoco et al., 2014). Por tanto, aunque el sistema de control del apetito se considera relativamente bien conservado entre los vertebrados, los estudios han demostrado que en los peces, las hormonas correspondientes y péptidos ortólogos pueden diferir en sus funciones basados en diferentes respuestas morfo-fisiológicas del tracto digestivo (Volkoff, 2016).

10.3 Grelina y su receptor

El ARNm de la grelina codifica una preprohormona, que incluye un péptido señal, un péptido maduro y regiones C-terminales. De esta manera, el procesamiento postraducciona da lugar a la formación de ghrelina biológicamente activa. Aunque el principal producto activo en los vertebrados es el péptido de 27-28 aminoácidos (denominado simplemente grelina); la grelina puede generar un segundo péptido denominado péptido grelina-asociado, que ya ha demostrado ser biológicamente activo en vertebrados, modulando la acción de la grelina (Delporte, 2013).

La grelina biológicamente activa en teleósteos es un péptido con 12-25 residuos de aminoácidos dependiendo de la especie (Bertucci et al., 2019; Jonsson et al., 2010; Kaiya et al., 2003). A pesar del número variable de aminoácidos, la secuencia de la grelina está relativamente bien conservada entre especies de peces, sobre todo en su amino terminal. Estos cuatro primeros aminoácidos forman el centro activo del péptido, caracterizado por la acilación de un tercer residuo de serina, principalmente serina n-octanoylada [acilGhr] (Kaiya et al., 2003).

Por lo tanto, la actividad funcional de la grelina de peces se ha evaluado utilizando su forma molecular acilada ya que diferentes autores suponen que la forma no acilada de esta hormona (DesAcylGhre) es inactiva, lo que sigue siendo controvertido. De hecho, las investigaciones en humanos demostraron la circulación sanguínea de ambas formas moleculares de grelina (Holmes et al., 2009). La actividad biológica de la grelina se deriva de su capacidad para unirse y activar los receptores GHS-R, descritos como receptores secretagogos de la hormona del crecimiento (Kaiya et al., 2010). Se han descrito dos GHS-R en vertebrados: uno es un receptor funcional acoplado a proteínas G con siete dominios transmembrana, denominado GHS-R1a, mientras que el otro es una forma truncada de GHS-R1a que carece del dominio transmembrana 5, denominada GHS-R1b (Albarrán-Zeckler y Smith, 2013).

Diferentes autores han informado de estas isoformas GHS-R en peces teleósteos como el besugo negro (*Pagellus bogaraveo*), pez dorado (*Carassius caratus*) y el pez cebra (*Danio rerio*) (Kaiya et al., 2013, 2010; Perello-Amorós et al., 2019; Small et al., 2019).

Según los análisis de expresión génica, en peces teleósteos el ARNm del GHS-R se produce en muchos tejidos, relacionados con la regulación de la alimentación a nivel periférico y central (hígado, tracto gastrointestinal e hipotálamo) (Kaiya et al., 2010). De esta manera, la expresión de ARNm de GHS-R en tejido gastrointestinal apoya la teoría de que la grelina de los peces es un

señalizador periférico de la regulación del apetito; sin embargo, no existen estudios a nivel proteico que evalúen la presencia del péptido grelina en los tejidos gastrointestinales de los peces.

Aunque la digestión comienza cuando el alimento llega al tracto digestivo, para ser eficiente, requiere algunos pasos previos a la ingestión de orden fisiológico; es decir que además de la disponibilidad de alimento, depende de señales internas en el tracto gastrointestinal (Yúfera et al., 2012, 2014). Por lo tanto, el diseño de protocolos de alimentación diaria óptimos que promuevan una digestión más eficiente de los alimentos requiere un conocimiento más profundo de cómo el tiempo y la frecuencia de la alimentación pueden influir en los diferentes factores diarios del proceso digestivo, como la expresión molecular de los péptidos GIT. Es decir que puede haber un aumento del transcrito de grelina en los tejidos gastrointestinales y cerebrales tras los periodos preprandial, y una disminución tras la ingesta de alimentos en vertebrados (Ariyasu et al., 2001; Cummings, 2006; Fox et al., 2009; Reynolds et al., 2010).

Sin embargo, los resultados obtenidos en peces no son tan consistentes como los observados en mamíferos (Hevrøy et al., 2011; Jonsson et al., 2007; Pankhurst et al., 2008; Peddu et al., 2009; Unniappan et al., 2004), por lo tanto, la expresión de este péptido orexigénico debe evaluarse en cada especie de pez. Actualmente, la corvina *C. gilberti* se considera una especie marina promisoría para la diversificación de la acuicultura de peces por el gobierno chileno (Alvarez et al., 2020).

Para apoyar los protocolos de alimentación de esta especie, es necesario establecer marcadores fisiológicos para el desarrollo en cautiverio, lo que es posible mediante el conocimiento de los principales señalizadores de la respuesta fisiológica en la regulación del apetito. Por lo tanto, este estudio tuvo como objetivo investigar la expresión y la actividad orexigénica de la grelina de *C. gilberti*.

10.4 Expresión génica de grelina en peces

El ARNm de grelina en peces, se expresa principalmente a nivel el intestino, y se cree que está implicada en la regulación de una serie de funciones fisiológicas, incluyendo la regulación de hormonas liberadas por la pituitaria y la estimulación de la ingesta de alimentos (Unniappan y Peter, 2005). Ejemplo de ello son los niveles de expresión del transcrito de grelina en carpa china (*Ctenopharyngodon idellus*), que mostró mayores niveles en el tracto digestivo, seguido de músculo, hígado, hipotálamo, tejido adiposo blanco, corazón e hipófisis (Feng et al., 2013).

También se ha descrito que la grelina en peces tiene posibles efectos en el metabolismo hipotalámico, que intervienen en el control de la ingesta de alimentos, para el caso, en trucha

arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), se demostró que las acciones orexigénicas de esta hormona estaban asociadas a cambios en el metabolismo de ácidos grasos en el hipotálamo e inhibición de los mecanismos de detección de los mismos, que finalmente condujeron a potenciar los efectos neuropéptidos orexigénicos, y de este modo, la ingesta de alimentos (Velasco et al., 2016).

Por otra parte, se tiene conocimiento que tanto la grelina y su receptor están presentes no sólo en los tejidos periféricos como el estómago y el intestino, sino también en el sistema nervioso central (Kang et al., 2011). Estudios realizados por Liu et al., (2021) con juveniles de corvina amarilla (*Larimichthys crocea*) cultivada, sometida a periodos de ayuno, se encontró que los niveles de expresión génica de grelina fue significativamente mayor en estómago comparada con otros tejidos como músculos, cerebro, intestinos, hígado y riñón; lo que sugiere que esta hormona está involucrada en la respuesta al hambre. Similar respuesta se obtuvo en un estudio realizado por Álvarez et al. (2023) utilizando juveniles de corvina tambor (*Cilus gilberti*), cuyos resultados mostraron que la mayor expresión de ARNm de grelina aumentaron en el periodo preprandial, y disminuyeron después, lo que sugiere que la grelina posee la capacidad orexigénica reportada en otros peces teleósteos.

10.5 Efecto del estrés sobre grelina en peces

Mantener el equilibrio de la homeostasis es un desafío constante, debido a los diversos factores estresantes que tienen que afrontar los peces de manera interna o externa, y cuando la homeostasis se ve amenazada o percibida como tal, es cuando ocurre el estrés; restableciéndose mediante diversos factores fisiológicos y conductuales, como respuestas adaptativas (Chrousos, 2009), y considerando que el bienestar animal es cada vez más importante, donde evitar el estrés crónico es una necesidad (Möstl y Palme, 2002), se hace necesario disponer de indicadores de estrés y su cuantificación, aunque la respuesta puede ser inter e intraespecíficas, asociadas al sexo, etapa de vida, y de manera temporal en las respuestas fisiológicas a los factores estresantes (Sopinka et al., 2016).

Estudios realizados con trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) confirmaron que la alimentación puede verse suprimida por estrés de confinamiento, donde los niveles de grelina plasmática, como en otros peces, parecen estar modulados por el estado de alimentación, por lo que sugiere jugar un papel orexigénico en esta especie (Pankhurst et al., 2008), de igual manera Bernier et al. (2012), en un estudio con carpa común (*Cyprinus carpio*) expuesta a una saturación de O² del 10% durante ocho días, encontró una reducción sustancial del 79% en el consumo de

alimento, en comparación con los peces mantenidos en condiciones normóxicas, lo que indica que la supresión del apetito en respuesta a la hipoxia crónica puede atribuirse a la modulación de señales anorexigénicas.

Este fenómeno plantea una amenaza cada vez mayor para los sistemas acuáticos, lo que lleva a mayores casos de hipoxia en términos tanto de intensidad como de frecuencia, lo que agrega un factor adicional al desafío del sector acuícola. Abordar el impacto de los bajos niveles de oxígeno disuelto es cada vez más imperativo a medida que el cambio climático continúa influyendo en la dinámica de los ambientes acuáticos (Pollock et al., 2007).

En peces teleósteos, existen sólidas evidencias que establecen una correlación directa entre los eventos de estrés y las alteraciones en la ingesta de alimentos, por lo que reconocer y delimitar los marcadores moleculares que interconectan estos dos procesos es imperativo para estandarizar diversos parámetros de cultivos piscícolas. Esto se vuelve especialmente crítico para especies en proceso de escalamiento productivo, como es el caso de *Cilus gilberti*, que se incluye activamente en programas de diversificación de la acuicultura en Chile y Perú. Los resultados iniciales de productividad destacan a *C. gilberti* como una especie marina prometedora para el cultivo de alta densidad. En particular, la especie muestra mayor capacidad de crecimiento en densidades superiores a 35 kg/m³ (Álvarez et al., 2020), sin embargo, se requiere realizar una investigación exhaustiva sobre si estas condiciones ejercen impactos más amplios en diversos procesos fisiológicos. Identificar y comprender los marcadores moleculares asociados con el estrés y la ingesta de alimentos en *C. gilberti* es fundamental para optimizar las prácticas acuícolas, contribuyendo así al éxito de las iniciativas de reproducción, y garantizar una producción sostenible en el contexto de la expansión de las operaciones acuícolas.

11. MATERIALES Y METODOS

Este apartado se llevó a cabo mediante la misma metodología del capítulo I (relativo a Leptina), documentado anteriormente, por lo tanto, en este capítulo, no se ilustran los bioensayos.

11.1 Recepción y mantenimiento de peces

Los juveniles de *Cilus gilberti* (N = 150; 90-100 g) se obtuvieron de las instalaciones de la Fundación Chile en la bahía de Tongoy, Coquimbo, Chile, y trasladados al laboratorio de piscicultura de la Universidad Católica del Norte, en Coquimbo. Los peces fueron mantenidos en

seis estanques circulares de fibra de vidrio de 0,5 m³ cada uno, conteniendo 25 peces, se utilizaron bombas de oxígeno, filtros biológicos, unidades de esterilización ultravioleta y flujo continuo de agua de mar. Los peces fueron alimentados a mano hasta la saciedad (dieta comercial con 45% de proteínas y 20% de lípidos), tres veces al día (09:00; 14:00 y 17:30 h), con un período de adaptación preexperimental de 4 semanas. Durante el período experimental, se comprobaron diariamente los niveles de oxígeno disuelto (OD) (7,3 mg/mL ±0,5) y la temperatura (17,1 °C ± 1,2) mediante una sonda multiparámetro (YSI, Inc.). Los peces se mantuvieron bajo un fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad (12 L:12 O). Vale aclarar que no se detectaron variaciones en los parámetros de calidad del agua entre los grupos experimentales; además no se utilizaron tratamientos químicos ni antibióticos en ningún momento.

Los peces se mantuvieron y manipularon siguiendo las directrices de procedimientos experimentales aprobados por el Comité de Ética de la Universidad Católica del Norte (protocolo número CEC_15/2018 con fecha de aprobación 15 de noviembre de 2018).

11.2 Bioensayo de hipoxia crónica

En este estudio se utilizaron aleatoriamente 200 juveniles corvina de *C. gilberti*, con una masa media de 200 g, y se distribuyeron en ocho tanques cónicos de 250 L, 25 peces por tanque, con agua de mar dentro de un sistema de flujo abierto, asegurando una temperatura estable de 16,5 ± 0,5°C y suficiente aireación. Tras un periodo de aclimatación de dos semanas, los peces se dividieron en dos grupos, cada uno con cuatro tanques.

El primer grupo, que sirvió de control, permaneció en condiciones normóxicas (7,8 mg/L de OD) durante todo el experimento, mientras que el segundo grupo fue sometido a eventos hipóxicos diarios (2 mg/L OD) con 3 horas de duración cada uno, durante 30 días, con los siguientes intervalos de 0h, 15 y 30 días. Después de cada período, se tomaron muestras de hígado del grupo control y expuestos a hipoxia, mediante la metodología descrita en el bioensayo anterior.

11.3 Bioensayo pre y posprandial

Posterior a un periodo de adaptación, los juveniles de *C. gilberti* se dividieron en dos grupos en cuatro tanques: un grupo para el muestreo preprandial y otro para el posprandial, garantizando que los peces muestreados posprandial no fueran perturbados por el muestreo preprandial, de tal manera tuvieran comportamiento alimentario normal.

En el muestreo preprandial se utilizaron de 2 peces por tanque, una hora antes del inicio de la primera comida diaria, mientras que el muestreo posprandial de 2 peces por tanque, y se realizó 1 h y 6 h después de la primera comida de la mañana. Los peces muestreados fueron capturados y sacrificados mediante una sobredosis anestésica (200 mg/L de Tricafina MS-222 en agua de mar).

Cuando estaban sedados, se registró del peso corporal (PC) y la longitud, además, se tomaron muestras de sangre de la vena caudal, con jeringas heparinizadas de 1 mL, y luego se centrifugaron a 5000g durante 5 min a 4 °C, la fracción plasmática se almacenó a - 20 °C. Las porciones de tejido estomacal para la extracción de ARN se colocaron en tubos estériles que contenían 400 µL de RNAlater® (Thermo Fisher) y se almacenaron a - 80 °C antes de su posterior análisis.

11.4 Extracción de ARN, obtención de secuencias codificantes para grelina, y receptor de grelina (GHS-R) de *C. gilberti*

La extracción de ARN de cada tejido inició añadiendo 500 µL de Trizol a 50 mg de tejido, seguido de homogeneización en un equipo Mini beat (Biospec, EE.UU.) durante 10 segundos. A continuación, se homogenizó y se centrifugó a 8000xg durante 10 minutos a 4 °C, y el sobrenadante se recuperó mediante posterior adición de 400 µL de cloroformo. Tras agitar en vórtex a temperatura ambiente, la solución se centrifugó a 12 000xg durante 15 minutos a 4°C. La capa superior transparente se transfirió cuidadosamente y se cargó en columnas comerciales del kit E.Z.N.A. (Omega Biotec), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se realizó la cuantificación del ARN (absorbancia) con el equipo Epoch (Microplate spectrophotometer BioTek), y se evaluó la integridad mediante electroforesis de agarosa.

Para realizar la transcripción inversa, se utilizaron 500 ng de cada muestra de ARN, utilizando el kit de transcripción inversa de ADNc de gran capacidad (Applied Biosystems™), siguiendo el protocolo del fabricante.

Para obtener las secuencias codificantes de grelina y su receptor, se utilizaron partidores heterólogos dirigidos a regiones conservadas de las secuencias descritas para estos genes, en especies estrechamente relacionadas con *C. gilberti*. Los productos de PCR obtenidos se sometieron a secuenciación por la empresa Macrogen, República de Corea. Las secuencias resultantes se depositaron en GenBank con los códigos de acceso ON568235.1 (Ghre-1), OQ349513.1 (GHS-R).

11.5 Alineamientos múltiples de secuencias de aminoácidos de *C. gilberti* con teleósteos homólogos, y filogenia de grelina

Con la finalidad de establecer la similitud entre las secuencias de aminoácidos de *C. gilberti* con teleósteos homólogos, se realizó el alineamiento de estas, mediante el uso de Herramienta Básica de Búsqueda de Alineamientos Locales (BLAST), aplicaciones desarrolladas en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Para ello se organizaron las secuencias de nucleótidos en formato FASTA de las especies a comparar.

El árbol filogenético de la grelina, se realizó considerando la filogenia para la inferencia bayesiana utilizando el método MCMC con modelo de verosimilitud, el cual se basa en el cálculo de la probabilidad de que dicho árbol sea correcto, dados los datos y un modelo evolutivo.

11.6 Análisis bioinformático de la secuencia de nucleótidos de grelina de *C. gilberti*

La secuencia parcial codificante de grelina de *C. gilberti* (cgGhre) se obtuvo mediante la búsqueda de secuencias superpuestas entre sí (contigs) de *C. gilberti*, proporcionadas por Fundación Chile. Así mismo, se diseñaron partidores usando el software Primer3 Input, para la amplificación de estas secuencias, tal como se muestran en la Tabla Suplementaria 1. El ADNc de estómago se utilizó como templado para amplificar cgGhre. El producto de PCR de 333 pares de bases (pb) fue purificado utilizando el protocolo E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit (Omega Biotek). La secuencia del amplicón se verificó mediante secuenciación (Macrogen Inc., Seúl, Corea). La homología de secuencias se estableció mediante el uso de herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST, por sus siglas en inglés), (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

La secuencia de la proteína putativa se obtuvo del portal Expasy (<http://www.expasy.org/>), mientras que para los alineamientos múltiples se utilizaron las herramientas ClustalW del software MEGA 6.0. La estimación de la divergencia evolutiva entre la matriz de secuencias de nucleótidos para el péptido grelina de teleósteos.

El análisis filogenético se realizó con Mr.Bayes v3.2.6 online Bayesian Inference of Phylogeny (http://www.phylogeny.fr/one_task.cgi?task_type=mrbayes); este programa utiliza el método MCMC para estimar la distribución posterior de los parámetros del modelo (Ronquist y Huelsenbeck, 2003).

Los modelos bioinformáticos de estructura terciaria de la grelina putativa madura de *C. gilberti* se analizaron en el servidor web PEP-FOLD3 (<http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD3>) (Lamiable et al., 2016). Después de elegir el mejor modelo, se construyó la estructura 3D del péptido utilizando PyMOL.

Para el análisis filogenético, se recuperaron secuencias de aminoácidos homólogas en otras especies (peces y mamíferos) de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando la secuencia de *C. gilberti* como referencia.

11.7 Expresión génica de grelina mediante RT-qPCR

Para amplificar el ARNm de grelina y su receptor de *C. gilberti*, se diseñaron partidores específicos, y se utilizó β -actina como gen de mantenimiento, para normalizar los valores de C_T del gen de interés, se realizaron pruebas estadísticas de los valores de expresión de β -actina entre las diferentes condiciones, no encontrándose diferencias significativas entre ellas ($P > 0,05$). La RT-qPCR se realizó utilizando 20 μ L de mezclas de reacción que contenían Takyon™ SyberGreen/ROX qPCR Master Mix (EUROGENTEC, EE.UU.), 0,3 μ M (concentración final) de cada partidador, y 2 μ L de ADNc.

La eficiencia (E) de los pares de partidores se calcularon a partir de las pendientes dadas según la ecuación $E = 10^{[-1/\text{pendiente}]}$. Los análisis se llevaron a cabo en un equipo Mx3000P qPCR System (Agilent Technologies) con un paso de desnaturalización inicial de 10 min a 95 °C seguido de 40 ciclos de PCR de desnaturalización (95 °C, 15 s), hibridación-elongación (60 °C, 1 min); y por último se obtuvo la curva de fusión a 75-95 °C, con una tasa de calentamiento de 0,1 °C por segundo, y medición continua de la fluorescencia. La expresión relativa se calculó mediante el método $-2\Delta\Delta C_Tq$ (Livak y Schmittgen, 2001), utilizando los valores del ciclo de cuantificación (C_q) medidos del gen de mantenimiento β -actina para normalizar los valores C_q medidos del gen diana.

11.8 Análisis estadístico

La significación estadística de los datos se analizó con el programa informático R versión 3.5.2. Antes del análisis estadístico, se comprobó la normalidad y la homocedasticidad mediante las pruebas de Shapiro-wilk y Fligner-Killeen respectivamente.

La expresión basal de ARNm de Ghre y GHS-R1 en los tejidos, se sometieron a la prueba de Kruskal-Wallis. Los parámetros bioquímicos sanguíneos (glucosa), la ingesta de alimentos y la

expresión de ARNm de Grelina tras los periodos preprandial y posprandial se analizaron mediante ANOVA unidireccional seguido de comparaciones de medias de Tukey. Por último, los niveles de grelina en sangre (péptido sintético) se analizaron mediante la prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon.

Las diferencias se consideraron significativas cuando $P < 0,01$ (**) o $P < 0,05$ (*). Los resultados se representan gráficamente mediante GraphPad prism 8.1 como la media \pm desviación estándar (DE) de las réplicas biológicas.

12. RESULTADOS

12.1 Alineamientos múltiples de secuencias de aminoácidos de grelina de *C. gilberti* con teleósteos homólogos

Los resultados de los alineamientos de aminoácidos, para *C. gilberti*, con respecto a los siguientes teleósteos: *Larimichthys crocea*, *Micropterus salmoides*, *Epinephelus coioides*, *Siniperca chuatsi*, *Scophthalmus maximus*, *Lateolabrax maculatus*, *Sparus aurata*, *Acanthopagrus schlegelii*, *Seriola dumerili*, *Dicentrarchus labrax*, y *Morone saxalitis*, mostraron secuencias conservadas de aminoácidos de propeptidos, y del péptido maduro, así mismo, sitios de escisión putativos de la prorelina (Figura 18).

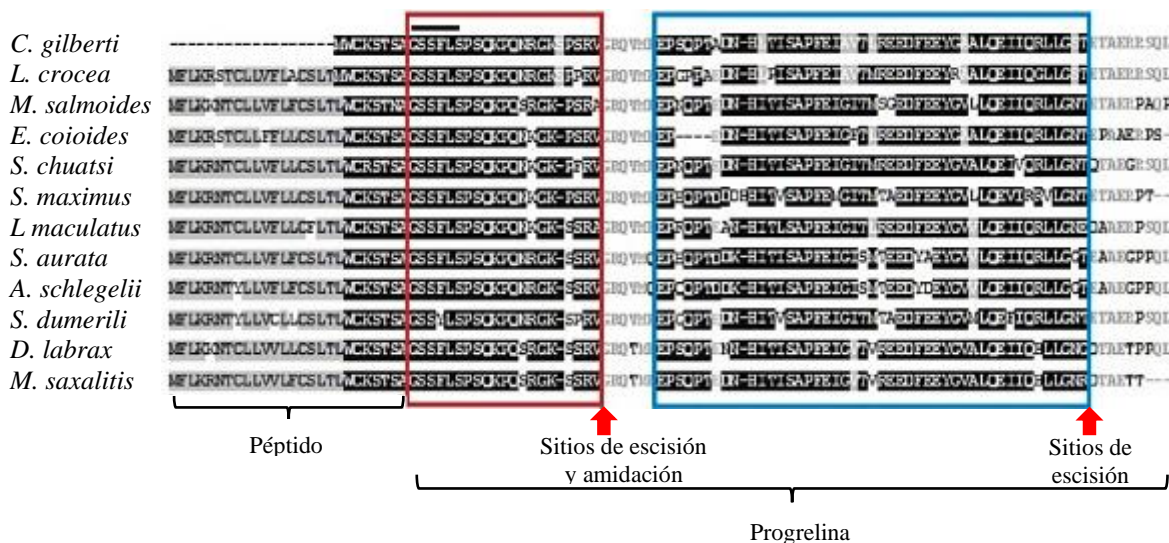


Figura 18. Alineamientos múltiples de secuencias de aminoácidos de grelina en especies de teleósteos.

Los aminoácidos idénticos están resaltados en negro e impresos en letras blancas. Los sitios de escisión putativos se muestran con flechas rojas. Los péptidos maduros después del procesamiento del propeptido se indican con líneas rojas

Relativo al árbol filogenético de grelina, para la inferencia filogenética bayesiana utilizando métodos MCMC con modo de verosimilitud, de las especies *Larimichthys crocea*, *Micropterus salmoides*, *Epinephelus coioides*, *Siniperca chuatsi*, *Scophthalmus maximus*, *Lateolabrax maculatus*, *Sparus aurata*, *Acanthopagrus schlegelii*, *Seriola dumerili*, *Dicentrarchus labrax*, *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo salar* y *Morone saxatilis*, se pudo establecer el porcentaje de réplicas del árbol en los que los taxones asociados se agruparon juntos en las 10.000 réplicas (Figura 5).

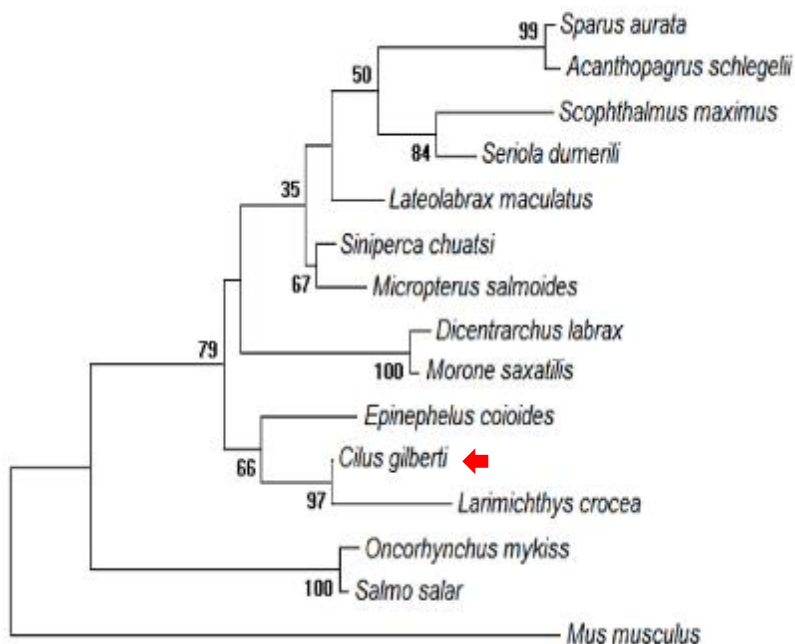


Figura 19. Árbol filogenético de secuencias de aminoácidos de grelina. Para la inferencia filogenética bayesiana utilizando métodos MCMC con modo de verosimilitud. El porcentaje de réplicas del árbol en los que los taxones asociados, se agruparon en las 10.000 réplicas que se muestran junto a las ramas. El árbol está dibujado a escala, con las longitudes de rama en las mismas unidades que las de las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Cada rama contendrá el número de acceso al GenBank correspondiente a las secuencias utilizadas para la reconstrucción junto al nombre de la especie, designando a la variante homóloga.

12.2 Expresión basal de ARNm de grelina en diferentes tejidos de *C. gilberti*

Los niveles de transcritos de ARNm fueron analizados en siete tejidos obtenidos de los grupos del experimento preprandial, que incluían: bazo, branquias, ciegos pilóricos, estómago, intestino, músculo y bazo (Figura 20).

Los resultados apuntan a que los niveles de expresión del transcrito de grelina fue mayor a nivel del estómago, fue altamente significativo ($P < 0,05$), alrededor de 1000 veces más con

respecto a los demás tejidos, seguido por tejido musculo blanco, 10 veces más con respecto a los demás tejidos. Seguido por intestino y el resto de los tejidos.

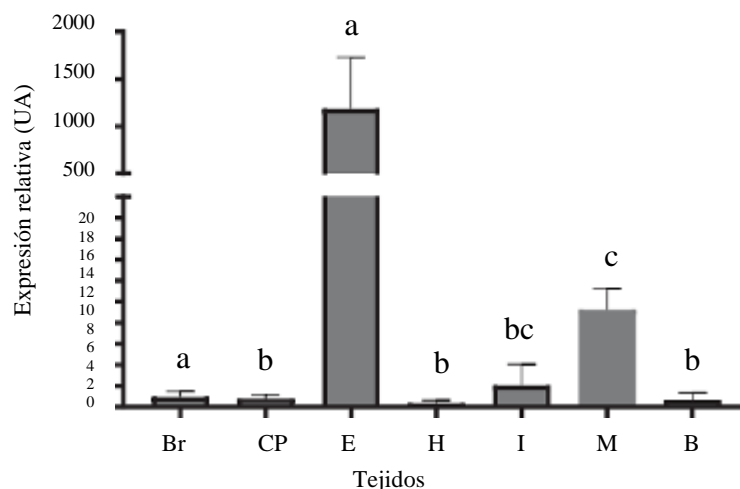


Figura 20. Expresión basal de ARNm de grelina en diferentes tejidos de *C. gilberti*. Branquias (Br), Ciegos pilóricos (CP), Estómago (E), Hígado (H), Intestino (I), Músculo (M) y Bazo (B). Los datos se presentan como expresión génica relativa, con β -actina como normalizador; y se enuncia la media \pm SD, cuyas diferencias significativas se consideraron cuando $P < 0,05$ y se indicaron con una letra diferente, con ($n = 6$).

12.3 Expresión basal de ARNm del receptor de grelina (GHS-R) en diferentes tejidos de *C. gilberti*

Los resultados de la expresión relativa de ARNm del receptor de grelina (GHS-R) en diferentes tejidos de *C. gilberti*, se pudo demostrar que en estómago y ciegos pilóricos tuvieron los mayores niveles de expresión de GHS-R, y no hubo diferencias significativas entre sí; mientras que los tejidos de riñón, intestino, corazón y músculo fueron estadísticamente similares entre sí (Figura 21).

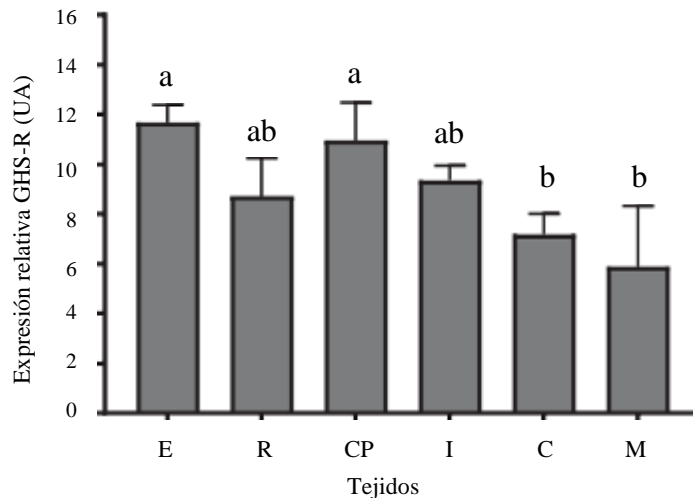


Figura 21. Expresión basal de ARNm de GHS-R en diferentes tejidos de *C. gilberti*. Estómago (E), Riñón (R), Ciegos pilóricos (CP), Intestino (I), Corazón (C) y Músculo (M). Los datos se presentan como expresión relativa de ARNm, con β -actina como normalizador; y se enuncia la media \pm SD, cuyas diferencias significativas se consideraron cuando $P < 0,05$ y se indicaron con una letra diferente, con ($n = 6$).

12.4 Expresión relativa de ARNm de grelina en estómago de *C. gilberti*, por periodos de alimentación pre y posprandial

Los resultados de la expresión relativa de ARNm en tejido de estómago de *C. gilberti* en períodos de alimentación preprandial (1 h) y posprandial (1 y 6 h), analizados estadísticamente, se pudo determinar que 1 hora antes de recibir alimento, los juveniles de *C. gilberti*, mostraron mayores niveles de expresión relativa de grelina (25 UA) ($P < 0,01$). Sin embargo, 1 hora después de ser alimentados, mostraron una disminución en la expresión relativa de la misma hormona (13 UA), que al compararlas entre ambas condiciones de alimentación, fueron altamente significativa; mientras que 6 horas después de que los peces fueron alimentados, los niveles de expresión relativa de grelina, se incrementa gradualmente (16 UA), (Figura 22).

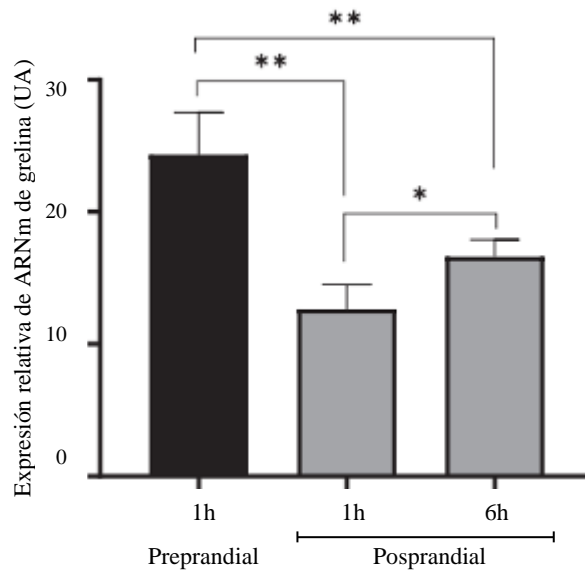


Figura 22. Expresión relativa de ARNm de grelina en estómago de *C. gilberti* en períodos preprandial y posprandial.
 Los datos se presentan con media \pm SD y las diferencias se consideraron significativas cuando $P < 0,01$ (**) o $P < 0,05$ (*), $n = 8$.

12.5 Expresión de ARNm de grelina en estómago de *C. gilberti*, sometidos a hipoxia crónica

Los resultados obtenidos, mostraron que la expresión génica de ARNm de grelina en peces normóxicos, mostraron una tendencia a la disminución al día 15, y una recuperación al día 30, mientras que los peces hipóxicos mostraron una tendencia sostenida a la baja. ($P > 0,05$), (Figura 23).

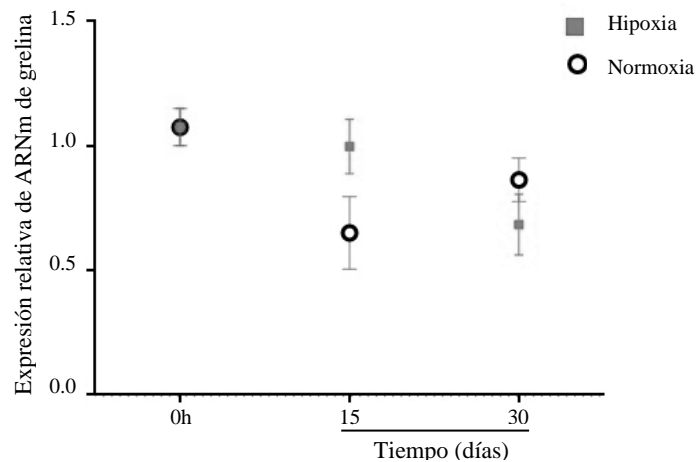


Figura 23. Expresión relativa de ARNm de grelina en estómago de *C. gilberti* sometidos a hipoxia crónica.
 Los datos se presentan con media \pm SD y las diferencias se consideraron significativas cuando $P < 0,01$ (**) o $P < 0,05$ (*), $n = 8$.

13. DISCUSIÓN

13.1 Caracterización y análisis comparativo de secuencias codificantes de grelina de *C. gilberti* con teleósteos homólogos

Mediante los experimentos se pudo demostrar que las variaciones medioambientales y la gestión de la producción pueden afectar la biología de los peces criados en sistemas intensivos, como la ingesta de alimento. Con el fin de proporcionar una herramienta útil para investigación sobre corvina *C. gilberti*, como una nueva especie en la industria acuícola suramericana, en este trabajo se abordó la caracterización de la hormona de grelina, una molécula descrita en otras especies de peces, sumamente importante en el control del apetito (Bertucci et al., 2019; Jönsson, 2013).

En primer lugar, se obtuvo un fragmento de ADNc de grelina de 273 pb, a partir del genoma contig de *C. gilberti*, y luego se confirmó mediante amplificación por PCR a partir de muestras de estómago de juveniles de *C. gilberti*, cuyas secuencias habían sido depositada en Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), con el código de acceso número ON568235.1 (Ghre-1), y su receptor con código de acceso número OQ349513.1 (GHS-R).

Mediante el alineamiento de secuencias de aminoácidos se pudo demostrar alta conservación de secuencias, así como los sitios de escisión enzimática en las diferentes especies de teleósteos, dando lugar a los péptidos bioactivos maduros de grelina, y al péptido asociado a dicha hormona. Después del proceso proteolítico del propéptido de *C. gilberti*, se produce una grelina madura con 21 residuos de longitud. De la misma manera, se pudo observar que, en la grelina de la especie en estudio, se conserva una señal de amidación del extremo carboxilo-terminal, caracterizada por tener una glicina seguida de un residuo básico de arginina.

De igual manera hay que mencionar, además que la secuencia de aminoácidos de la grelina de *C. gilberti* mostró alta conservación con las secuencias de la mayoría de teleósteos (Figura 18).

La estructura amida en el C-terminal, fue identificada por primera vez en grelina de la anguila japonesa (*Anguilla japonica*), la cual aún no se ha observado en grelina de mamíferos (Kaiya et al., 2003; Kaiya et al., 2008). La amidación de la grelina en los peces tiene importancia fisiológica en su bioactividad, ya que los péptidos amidados son menos sensibles a la degradación proteolítica, lo que prolonga su vida media en el torrente sanguíneo (Kumar et al., 2014).

Una característica única del péptido maduro de grelina en mamíferos y teleósteos, es la modificación de Ser-3 con ácido graso, principalmente ácido octanoico (Kaiya et al., 2008);

Kojima y Kangawa, 2005; Nishi et al., 2011). De este modo, los cuatro aminoácidos N-terminales de la grelina de teleósteos, incluyendo grelina de *C. gilberti* está altamente conservada (Figura 4). Estos residuos fueron reconocidos como el "núcleo activo" de la grelina, porque se describe como esencial para la unión al receptor. (Kaiya et al., 2008).

El análisis filogenético, permitió constatar que la grelina de *C. gilberti* se agrupó en el mismo clado de la familia Sciaenidae, con mayor identidad a corvina amarilla (*Larimichthys crocea*), confirmando los resultados de la conservación de secuencias antes descritas (Figura 19).

Estudios filogenéticos y genómicos comparativos de mamíferos y vertebrados no mamíferos, ha demostrado que la grelina es una hormona que aparentemente ha evadido la selección natural durante una larga historia evolutiva, revelando su importante en la señalización (Kaiya et al., 2011).

13.2 Expresión basal de ARNm de grelina y su receptor (GHS-R) en diferentes tejidos de *C. gilberti*.

La expresión del ARNm basal de la grelina de *C. gilberti* se detectó los tejidos que incluían branquias, ciegos pilóricos, estómago, hígado, intestino, músculo y bazo. Los niveles de expresión en todos los tejidos se expresan en relación con las branquias (Figura 20). Se puede observar que la expresión relativa de grelina fue mayor a nivel de estómago, seguido del músculo, mientras que la expresión más baja se encontró en el hígado y el bazo.

Este resultado es similar al encontrado por Liu et al., (2021) en corvina amarilla (*L. crocea*), la cual está estrechamente emparentada con la corvina *C. gilberti*. Sin embargo, se han descrito diferentes niveles de expresión del transcrito de grelina en otras especies de peces, por ejemplo, en la carpa gibelio (*Carassius auratus gibelio*), donde se observó una elevada expresión de ghrelina en el tracto intestinal, seguido del hígado. En contraste, se observó una baja expresión en el corazón, cerebro, piel, músculos branquias y ojos (Kitazawa y Kaiya., 2019; Zhou et al., 2016).

Así mismo, los niveles de expresión del ARNm basal del receptor de la grelina (GHS-R) de *C. gilberti*, además de detectarse en estómago, se detectó en ciegos pilóricos, lo que sugiere una función reguladora en este tejido (Figura 21). Se sabe que la actividad biológica de la grelina se deriva de su capacidad para unirse y activar los receptores GHS-R, descritos como receptores secretagogos de la hormona del crecimiento (Kaiya et al., 2010).

En vertebrados se han descrito dos GHS-R: uno es un receptor funcional acoplado a proteínas G con siete dominios transmembrana, denominado GHS-R1a, y el otro es un receptor funcional acoplado a proteínas G con siete dominios transmembrana, denominado GHS-R1a, mientras que

el otro es una forma corta de GHS-R1a que carece del dominio transmembrana 5, denominado GHS-R1b (Albarran-Zeckler y Smith, 2013). Diferentes autores han descritos estas estas isoformas de GHS-R en peces teleósteos, como el besugo negro (*Spondylisoma cantharus*) el pez dorado (*Carassius auratus*) y el pez cebra (*Danio rerio*) (Blanco et al., 2016; Kaiya et al; Perelló-Amorós et al., 2019; Small et al., 2019).

Además, la presencia de otro GHS-R, denominado GHS-R2a, en el pez cebra, el bagre y peces de colores, muestra una secuencia de aminoácidos similar a la de GHSR1a (Kaiya et al., 2010; Small et al., 2019). Según el análisis de la expresión mRNA de GHS-R se produce en muchos tejidos de los peces *C. gilberti*, incluyendo aquellos críticos en la regulación periférica y central de la alimentación, como el cerebro, el hígado y el tracto gastrointestinal.

La funcionalidad del GHS-R de los peces teleósteos se ha confirmado mediante la cuantificación del Ca^{2+} intracelular cuando células humanas transfectadas con el receptor son estimuladas por grelina de bagre y mediante el uso del antagonista de la grelina [D-Lys3]-GHRP-6 (Nisembaum et al., 2014; Small et al., 2019).

Por lo tanto, los estudios futuros podrían centrarán en la funcionalidad de las formas moleculares de grelina en la capacidad de activar el GHS-R en estos tejidos de *C. gilberti*.

13.3 Expresión de ARNm de grelina en estómago de *C. gilberti*, , y efectos en periodos de alimentación

Los resultados de la expresión relativa de ARNm en tejido de estómago de *C. gilberti* en períodos de alimentación preprandial y posprandial, se pudo determinar que a nivel preprandial, los peces (*C. gilberti*), mostraron mayores niveles de expresión relativa de grelina (25 UA) ($P < 0,01$). Sin embargo, 1 hora posprandial, mostraron una reducción en la expresión relativa de grelina (13 UA), al compararlas entre ambas condiciones de alimentación, fueron altamente significativa; mientras que 6 horas posprandial, los niveles de expresión relativa de grelina, se incrementa gradualmente (16 UA) (Figura 22).

Resultados similares se han reportado en otros teleósteos, en relación a la expresión de ARNm de la grelina en peces de colores (Unniappan y Peter, 2005), tilapia de Mozambique, *Oreochromis mossambicus* (Kaiya et al., 2003), tilapia del Nilo, *Oreochromis niloticus* (Parhar et al., 2003), trucha arco iris, *O. mykiss* (Jönsson et al., 2010), salmón atlántico, *Salmo salar* (Murashita et al., 2009; Del Vecchio et al., 2021), carpa gibelio, *Carassius auratus gibelio* (Zhou et al., 2016), carpa

herbívora, *Ctenopharyngodon idellus* (Liang et al., 2019) y corvina amarilla grande *Larimichthys crocea* (Huang et al., 2020).

En los peces teleósteos, los periodos de ayuno prolongado han incrementado significativamente la síntesis de grelina en su estómago o intestino (Zhou et al., 2016). En el caso de la grelina de vertebrados, existen cantidades mucho mayores de DacylGrelina que de acilGrelina en la sangre, donde más del 90% de la inmunorreactividad para la grelina es para la forma no acilada, tanto en ratas como en humanos (Nishi et al., 2011). Estudios en humanos mostraron que los niveles de DacylGrelina posprandiales (dos horas después del consumo de la comida), no cambiaron, mientras que los niveles de acilGrelina disminuían (Dardzińska et al., 2014), por lo tanto, es probable que las diferentes formas moleculares de grelina puedan modular estas sensaciones de forma diferente.

En mamíferos, los efectos de la grelina van más allá de la regulación del apetito, incluyen la regulación de la motilidad intestinal, el ritmo sueño-vigilia, la sensación gustativa, el comportamiento de búsqueda de compensación y regulación del metabolismo de la glucosa (Poher et al., 2018).

13.4 Efectos de hipoxia crónica sobre la expresión de ARNm de grelina en estómago de *C. gilberti*

La hipoxia es una amenaza cada vez mayor para la industria acuícola, a pesar de que los niveles fluctuantes de oxígeno disuelto (OD) pueden ser un fenómeno natural, es decir que la hipoxia puede ser causada por la eutrofización y la contaminación orgánica, considerada entre los principales problemas de contaminación del agua a nivel mundial (Pollock et al., 2007). Es decir que los peces podrían estar expuestos rutinariamente a la hipoxia ambiental severa, y resistir a esos cambios ambientales (Grace et al., 2001), también debido al aumento de la temperatura del agua, o la presencia de flora acuática, que consumen oxígeno ambiental, y conduce a una rápida reducción del oxígeno en el agua.

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que la expresión génica de ARNm de grelina tanto los peces normóxicos y aquellos sometidos a hipoxia crónica fueron similares en diferentes tiempos. ($P > 0,05$), (Figura 23), con una tendencia a la baja en peces normóxicos para el día 15, con una notable recuperación para el día 30, sin embargo, los peces hipóxicos mostraron

un comportamiento general a la baja, lo que sugiere altos niveles de resiliencia bajo estas condiciones ambientales.

A menudo es difícil establecer niveles límite para el estrés crónico, por lo que se usan niveles aumentados de cortisol para determinar cuándo un ambiente se vuelve estresante (Van Weerd y J. Komen., 1998), aunque se sabe que el consumo de alimento y la tasa de crecimiento están vinculados, y son de suma importancia para el éxito de la acuicultura; mejorar la producción, la supervivencia, la conversión de alimentos, y rentabilidad se vuelven fundamentales en esta industria (Kumar et al., 2020).

Tomando en cuenta que la hipoxia controla el metabolismo en varios niveles, ya sea a través de la producción de ATP mitocondrial, la absorción de glucosa y la glucólisis; sin embargo, la complejidad de la respuesta de la hipoxia y los enlaces a los péptidos u hormonas involucradas en la ingesta de alimentos y el control del apetito en los diferentes órganos no son bien conocidos (Kietzmann y Mäkelä., 2021).

Es decir que la hipoxia crónica en teleósteos puede tener efectos significativos a nivel fisiológicos y de comportamiento, donde la grelina juega un papel importante en la regulación del apetito y el metabolismo (Volkoff, 2016). En mamíferos, la hipoxia crónica causa la apoptosis de los miocitos cardíacos, sin embargo, la producción de energía por glucólisis anaeróbica protege el miocardio contra las lesiones de este fenómeno (Aliparasti et al., 2012).

14. CONCLUSIONES

Ya que el propósito de este estudio fue identificar y caracterizar el péptido orexigénico grelina en corvina *C. gilberti*, además, se puede decir que, por primera vez se ha revelado la secuencia del péptido grelina, que está altamente conservada entre peces teleósteos, especialmente en el núcleo activo del extremo N-terminal. Así mismo, se puede detallar que la grelina de *C. gilberti* se expresa en gran medida en el estómago y en menor escala en otros tejidos del tracto gastrointestinal, lo que sugiere que la grelina podría estar involucrada en otras funciones fisiológicas en el proceso digestivo de estos órganos.

Al observar los perfiles de expresión del ARNm de la grelina durante los periodos pre y posprandial, se puede concluir que la grelina puede ser un inductor del apetito en esta especie. Además, el resultado de los estudios in vivo confirma la bioactividad orexigénica, indicando que las formas moleculares de la grelina aumentan la ingesta de alimento, e interactúan localmente con

los tejidos digestivos en *C. gilberti*. Este es el primer estudio con péptidos reguladores de esta especie, proporciona una base para futuras investigaciones sobre los mecanismos reguladores y las funciones que desencadenan el papel de los péptidos orexigénicos en especies acuícolas de esciénidos.

Hay que mencionar, además, que los resultados de los estudios realizados in vivo, confirman la bioactividad orexigénica, indicando que las formas moleculares de grelina aumentan el consumo de alimento, la absorción de nutrientes e interactúan localmente con los tejidos digestivos de *C. gilberti*, proporcionando así una base para futuras investigaciones sobre los mecanismos reguladores y las funciones que desencadenan el papel de los péptidos orexigénicos en especies acuícolas de esciénidos.

15. REFERENCIAS

- Alvarez, C.A., Jerez-Cepa, I., Carcamo, C.B., Toledo, P., Flores, H., Brokordt, K., 2020. Growth performance, physiological responses to hypoxia and flesh quality of Chilean croaker (*Cilus gilberti*) stocked at different densities. *Aquaculture* 525, 735316. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735316>.
- Aliparasti, M. R., Alipour, M. R., Almasi, S., & Feizi, H. (2012). Effect of ghrelin on aldolase gene expression in the heart of chronic hypoxic rat. *International Journal of Endocrinology and Metabolism*, 10(3), 553.
- Ariyasu, H., Takaya, K., Tagami, T., Ogawa, Y., Hosoda, K., Akamizu, T., Suda, M., Koh, T., Natsui, K., Toyooka, S., Shirakami, G., Usui, T., Shimatsu, A., Doi, K., Hosoda, H., Kojima, M., Kangawa, K., Nakao, K., 2001. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 4753–4758. <https://doi.org/10.1210/JCEM.86.10.7885>.
- Bertucci, J.I., Blanco, A.M., Sundarajan, L., Rajeswari, J.J., Velasco, C., Unniappan, S., 2019. Nutrient regulation of endocrine factors influencing feeding and growth in fish. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 10, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00083>.
- Blanco, A.M., Gomez-Boronat, M., Redondo, I., Valenciano, A.I., Delgado, M.J., 2016. Periprandial changes and effects of short- and long-term fasting on ghrelin, GOAT, and ghrelin receptors in goldfish (*Carassius auratus*). *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 186, 727–738. <https://doi.org/10.1007/s00360-016-0986-0>.
- Blanco, A.M., Bertucci, J.I., Sanchez-Bretano, A., Delgado, M.J., Valenciano, A.I., Unniappan, S., 2017. Ghrelin modulates gene and protein expression of digestive enzymes in the intestine and hepatopancreas of goldfish (*Carassius auratus*) via the GHS-R1a: possible roles of PLC/PKC and AC/PKA intracellular signaling pathways. *Mol. Cell. Endocrinol.* 442, 165–181. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2016.12.027>.
- Boyd, C.E., D'Abramo, L.R., Glencross, B.D., Huyben, D.C., Juarez, L.M., Lockwood, G.S., McNevin, A.A., Tacon, A.G.J., Teletchea, F., Tomasso, J.R., Tucker, C.S., Valenti, W. C., 2020. Achieving sustainable aquaculture: historical and current perspectives and future needs and challenges. *J. World Aquacult. Soc.* 51, 578–633. <https://doi.org/10.1111/JWAS.12714>.

- Cummings, D.E., 2006. Ghrelin and the short- and long-term regulation of appetite and body weight. *Physiol. Behav.* 89, 71–84. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2006.05.022>.
- Dardzinska, J. A., Małgorzewicz, S., Kaska, Ł., Proczko, M., Stefaniak, T., Stankiewicz, M., & Ździński, Z. (2014). Fasting and postprandial acyl and desacyl ghrelin levels in obese and non-obese subjects. *Endokrynologia Polska*, 65(5), 377–381. <https://doi.org/10.5603/EP.2014.0052>
- Del Vecchio, G., Lai, F., Gomes, A.S., Verri, T., Kalanathan, T., Barca, A., Handeland, S., Rønnestad, I., 2021. Effects of short-term fasting on mRNA expression of ghrelin and the peptide transporters PepT1 and 2 in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Front. Physiol.* 12, 666670. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.666670>.
- Delporte, C., 2013. Structure and physiological actions of ghrelin. *Scientifica (Cairo)* 2013, 1–25. <https://doi.org/10.1155/2013/518909>.
- Du, G.M., Wu, J.G., Luo, B.P., Hu, Z.H., Li, L.A., Liu, M.J., 2016. RNAi-mediated ghrelin affects gastric H(+)-K(+)-ATPase activity and expression of GOAT-ghrelin system in vitro. *Gen. Comp. Endocrinol.* 228, 48–52. <https://doi.org/10.1016/J.YGCEN.2016.02.009>.
- Fernández, G., Cabral, A., Cornejo, M.P., De Francesco, P.N., Garcia-Romero, G., Reynaldo, M., Perello, M., 2016. Des-acyl ghrelin directly targets the arcuate nucleus in a ghrelin-receptor independent manner and impairs the orexigenic effect of ghrelin. *J. Neuroendocrinol.* 28, 1–12. <https://doi.org/10.1111/JNE.12349>.
- Fox, B.K., Breves, J.P., Hirano, T., Grau, E.G., 2009. Effects of short- and long-term fasting on plasma and stomach ghrelin, and the growth hormone/insulin-like growth factor I axis in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Domest. Anim. Endocrinol.* 37, 1–11. <https://doi.org/10.1016/J.DOMANIEND.2009.01.001>.
- Guzman, F., Gauna, A., Roman, T., Luna, O., Alvarez, C., Pareja-Barrueto, C., Mercado, L., Albericio, F., Cardenas, C., 2021. Tea bags for Fmoc solid-phase peptide synthesis: an example of circular economy. *Molecules* 26. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26165035>.
- Hevrøy, E.M., Azpeleta, C., Shimizu, M., Lanzén, A., Kaiya, H., Espe, M., Olsvik, P.A., 2011. Effects of short-term starvation on ghrelin, GH-IGF system, and IGF-binding proteins in Atlantic salmon. *Fish Physiol. Biochem.* 37, 217–232. <https://doi.org/10.1007/S10695-010-9434-3/TABLES/6>.
- Hiejima, H., Nishi, Y., Hosoda, H., Yoh, J., Mifune, H., Satou, M., Sugimoto, H., Chiba, S., Kawahara, Y., Tanaka, E., Yoshimatsu, H., Uchimura, N., Kangawa, K., Kojima, M., 2009. Regional distribution and the dynamics of n-decanoyl ghrelin, another acylform of ghrelin, upon fasting in rodents. *Regul. Pept.* 156, 47–56. <https://doi.org/10.1016/J.REGPEP.2009.05.003>.
- Holmes, E., Davies, I., Lowe, G., Ranganath, L.R., 2009. Circulating ghrelin exists in both lipoprotein bound and free forms. *Ann. Clin. Biochem.* 46, 514–516. <https://doi.org/10.1258/acb.2009.008254>.
- Hosoda, H., Kojima, M., Matsuo, H., Kangawa, K., 2000. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 909–913. <https://doi.org/10.1006/BBRC.2000.4039>.
- Hosseinimehr, S.J., Tolmachev, V., Orlova, A., 2012. Liver uptake of radiolabeled targeting proteins and peptides: considerations for targeting peptide conjugate design. *Drug Discov. Today* 17, 1224–1232. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2012.07.002>.
- Huang, W., Yao, C., Liu, Y., Xu, N., Yin, Z., Xu, W., Miao, Y., Mai, K., Ai, Q., 2020. Dietary allicin improved the survival and growth of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) larvae

- via promoting intestinal development, alleviating inflammation and enhancing appetite. *Front. Physiol.* 11, 587674 <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.587674>.
- Jönsson, E., Kaiya, H., & Björnsson, B. T. (2010). Ghrelin decreases food intake in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) through the central anorexigenic corticotropin-releasing factor system. *General and Comparative Endocrinology*, 166(1), 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.11.001>
- Jonsson, E., 2013. The role of ghrelin in energy balance regulation in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 187, 79–85. <https://doi.org/10.1016/J.YGCEN.2013.03.013>.
- Jonsson, E., Forsman, A., Einarsdottir, I.E., Kaiya, H., Ruohonen, K., Björnsson, B.T., 2007. Plasma ghrelin levels in rainbow trout in response to fasting, feeding and food composition, and effects of ghrelin on voluntary food intake. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 147, 1116–1124. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2007.03.024>.
- Jonsson, E., Kaiya, H., Björnsson, B.T., 2010. Ghrelin decreases food intake in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) through the central anorexigenic corticotropin-releasing factor system. *Gen. Comp. Endocrinol.* 166, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.11.001>.
- Kaiya, H., Kojima, M., Hosoda, H., Moriyama, S., Takahashi, A., Kawachi, H., Kangawa, K., 2003a. Peptide purification, complementary deoxyribonucleic acid (DNA) and genomic DNA cloning, and functional characterization of ghrelin in rainbow trout. *Endocrinology* 144, 5215–5226. <https://doi.org/10.1210/EN.2003-1085>.
- Kaiya, H., Kojima, M., Hosoda, H., Riley, L.G., Hirano, T., Grau, E.G., Kangawa, K., 2003b. Amidated fish ghrelin: purification, cDNA cloning in the Japanese eel and its biological activity. *J. Endocrinol.* 176, 415–423. <https://doi.org/10.1677/JOE.0.1760415>.
- Kaiya, H., Kojima, M., Hosoda, H., Riley, L.G., Hirano, T., Grau, E.G., Kangawa, K., 2003c. Identification of tilapia ghrelin and its effects on growth hormone and prolactin release in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 135, 421–429. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(03\)00109-X](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(03)00109-X).
- Kaiya, H., Miyazato, M., Kangawa, K., Peter, R.E., Unniappan, S., 2008. Ghrelin: a multifunctional hormone in non-mammalian vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 149, 109–128. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2007.12.004>.
- Kaiya, H., Miura, T., Matsuda, K., Miyazato, M., Kangawa, K., 2010. Two functional growth hormone secretagogue receptor (ghrelin receptor) type 1a and 2a in goldfish, *Carassius auratus*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 327, 25–39. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.06.004>.
- Kaiya, H., Kangawa, K., Miyazato, M., 2013. Ghrelin receptors in non-mammalian vertebrates. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00081>.
- Kalhor, H., Tong, S., Wang, L., Hua, Y., Volatiana, J.A., Shao, Q., 2018. Morphological study of the gastrointestinal tract of *Larimichthys crocea* (Acanthopterygii: Perciformes). *Zool.* 35, 1–9. <https://doi.org/10.3897/ZOOLOGIA.35.E25171>.
- Kapica, M., Puzio, I., Kuwahara, A., Zabielski, R., 2008. Role of feed-regulating peptides on pancreatic exocrine secretion - PubMed. *J. Physiol. Pharmacol.* 59, 145–159. Kitazawa, T., Kaiya, H., 2019. Regulation of gastrointestinal motility by motilin and ghrelin in vertebrates. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 10, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00278>.
- Kitazawa, T., & Kaiya, H. (2019). Regulation of gastrointestinal motility by motilin and ghrelin in vertebrates. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 10, Issue MAY). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00278>.
- Kietzmann, T., & Mäkelä, V. H. (2021). The hypoxia response and nutritional peptides. *Peptides*, 138, 170507.
- Kojima, M., Kangawa, K., 2005. Ghrelin: structure and function. *Physiol. Rev.* 85, 495–522. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00012.2004>.

- Krenning, E.P., Bakker, W.H., Kooij, P.P.M., Breeman, W.A.P., Oei, H.Y., De Jong, M., Reubi, J.C., Visser, T.J., Bruns, C., Kwekkeboom, D.J., Reijs, A.E.M., Van Hagen, P. M., Koper, J.W., Lamberts, S.W.J., 1992. Somatostatin receptor scintigraphy with indium-111-DTPA-D-Phe-1-octreotide in man: metabolism, dosimetry and comparison with iodine-123-Tyr-3-octreotide. *J. Nucl. Med.* 33, 652–658.
- Kumar, D., Eipper, B.A., Mains, R.E., 2014. Amidation. *Ref. Modul. Biomed. Sci.* <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.04040-X>.
- Lamiable, A., Thevenet, P., Rey, J., Vavrusa, M., Derreumaux, P., Tuffery, P., 2016. PEPFOLD3: faster de novo structure prediction for linear peptides in solution and in complex. *Nucleic Acids Res.* 44, W449–W454. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw329>.
- Liang, X., Yu, X., Han, J., Yu, H., Chen, P., Wu, X., Zheng, Y., Xue, M., 2019. Effects of dietary protein sources on growth performance and feed intake regulation of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Aquaculture* 510, 216–224. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.05.059>.
- Lin, X., Volkoff, H., Narnaware, Y., J, B.N., Peyon, P., Peter, R.E., 2000. Brain regulation of feeding behavior and food intake in fish. *Comp. Biochem. Physiol.*
- Lin, K.S., Luu, A., Baidoo, K.E., Hashemzadeh-Gargari, H., Chen, M.K., Pili, R., Pomper, M., Carducci, M., Wagner, H.N., 2004. A new high affinity technetium analogue of bombesin containing DTPA as a pharmacokinetic modifier. *Bioconjug. Chem.* 15, 1416–1423. <https://doi.org/10.1021/BC0498267>.
- Liu, F., Lv, X., Chu, T., Wang, M., Zhan, W., Lou, B., Liu, F., Lv, X., Chu, T., Wang, M., Zhan, W., Lou, B., 2021. Characterization of *ghrelin* mRNA expression in fasting *Larimichthys crocea* juveniles. *Acta Oceanol. Sin.* 40 (6), 35–40. <https://doi.org/10.1007/S13131-020-1692-Z>.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Luna, M., Llorente, I., Cobo, A., 2019. Determination of feeding strategies in aquaculture farms using a multiple-criteria approach and genetic algorithms. *Ann. Oper. Res.* 1–26 <https://doi.org/10.1007/s10479-019-03227-w>.
- Matsuda, K., Miura, T., Kaiya, H., Maruyama, K., Shimakura, S.-I., Uchiyama, M., Kangawa, K., Shioda, S., 2006. Regulation of food intake by acyl and des-acyl ghrelin in the goldfish. *Peptides* 27, 2321–2325. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.03.028>.
- Murashita, K., Kurokawa, T., Nilsen, T.O., Rønnestad, I., 2009. Ghrelin, cholecystokinin, and peptide YY in Atlantic salmon (*Salmo salar*): molecular cloning and tissue expression. *Gen. Comp. Endocrinol.* 160, 223–235. <https://doi.org/10.1016/j.yggen.2008.11.024>.
- Nisembaum, L.G., de Pedro, N., Delgado, M.J., Isorna, E., 2014. Crosstalking between the “gut-brain” hormone ghrelin and the circadian system in the goldfish. Effects on clock gene expression and food anticipatory activity. *Gen. Comp. Endocrinol.* 205, 287–295. <https://doi.org/10.1016/j.yggen.2014.03.016>.
- Nishi, Y., Yoh, J., Hiejima, H., Kojima, M., 2011. Structures and molecular forms of the ghrelin-family peptides. *Peptides* 32, 2175–2182. <https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2011.07.024>.
- Pankhurst, N.W., King, H.R., Ludke, S.L., 2008. Relationship between stress, feeding and plasma ghrelin levels in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Mar. Freshw. Behav. Physiol.* 41, 53–64. <https://doi.org/10.1080/10236240701661156>.

- Parhar, I.S., Sato, H., Sakuma, Y., 2003. Ghrelin gene in cichlid fish is modulated by sex and development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305, 169–175. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00729-0](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00729-0).
- Peddu, S.C., Breves, J.P., Kaiya, H., Gordon Grau, E., Riley, L.G., 2009. Pre- and postprandial effects on ghrelin signaling in the brain and on the GH/IGF-I axis in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 161, 412–418. <https://doi.org/10.1016/J.YGCEN.2009.02.008>.
- Perello-Amoros, M., Velez, E.J., Vela-Albesa, J., Sanchez-Moya, A., Riera-Heredia, N., Heden, I., Fernandez-Borras, J., Blasco, J., Calduch-Giner, J.A., Navarro, I., Capilla, E., Jonsson, E., Perez-Sanchez, J., Gutierrez, J., 2019. Ghrelin and its receptors in gilthead sea bream: nutritional regulation. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 9, 399. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00399>.
- Radzishevsky, I.S., Rotem, S., Zaknoon, F., Gaidukov, L., Dagan, A., Mor, A., 2005. Effects of acyl versus aminoacyl conjugation on the properties of antimicrobial peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 2412. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.6.2412-2420.2005>.
- Ray, A.K., Ringø, E., 2014. The gastrointestinal tract of fish. In: Daniel Merrifield, E.R. (Ed.), *Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1–13. <https://doi.org/10.1002/9781118897263.CH1>.
- Reynolds, C.B., Elias, A.N., Whisnant, C.S., 2010. Effects of feeding pattern on ghrelin and insulin secretion in pigs. *Domest. Anim. Endocrinol.* 39, 90–96. <https://doi.org/10.1016/J.DOMANIEND.2010.02.006>.
- Rønnestad, I., Gomes, A.S., Murashita, K., Angotzi, R., Jonsson, E., Volkoff, H., 2017. Appetite-controlling endocrine systems in teleosts. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 8, 73. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00073>.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572–1574. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTG180>.
- Shan, X., Quan, H., Dou, S., 2016. Morphological and histological changes in digestive tract development during starvation in the miiuy croaker. *Fish Physiol. Biochem.* 42, 529–546. <https://doi.org/10.1007/S10695-015-0157-3>.
- Small, B.C., Quiniou, S.M.A., Kaiya, H., Bledsoe, J.W., Musungu, B., 2019. Characterization of a third ghrelin receptor, GHS-R3a, in channel catfish reveals novel expression patterns and a high affinity for homologous ligand. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 229, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.11.013>.
- Tinoco, A.B., Naslund, J., Delgado, M.J., de Pedro, N., Johnsson, J.I., Jonsson, E., 2014. Ghrelin increases food intake, swimming activity and growth in juvenile brown trout (*Salmo trutta*), 124, pp. 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.10.034>.
- Toshinai, K., Yamaguchi, H., Sun, Y., Smith, R.G., Yamanaka, A., Sakurai, T., Date, Y., Mondal, M.S., Shimbara, T., Kawagoe, T., Murakami, N., Miyazato, M., Kangawa, K., Nakazato, M., 2006. Des-acyl ghrelin induces food intake by a mechanism independent of the growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* 147, 2306–2314. <https://doi.org/10.1210/EN.2005-1357>.
- Unniappan, S., Peter, R.E., 2005. Structure, distribution and physiological functions of ghrelin in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.02.011>.
- Unniappan, S., Canosa, L.F., Peter, R.E., 2004. Orexigenic actions of ghrelin in goldfish: feeding-induced changes in brain and gut mRNA expression and serum levels, and responses to central

- and peripheral injections. *Neuroendocrinology* 79, 100–108. <https://doi.org/10.1159/000076634>.
- Vikeså, V., Nankervis, L., Remø, S.C., Waagbø, R., Hevrøy, E.M., 2015. Pre and postprandial regulation of ghrelin, amino acids and IGF1 in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) at optimal and elevated seawater temperatures. *Aquaculture* 438, 159–169. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2014.12.021>.
- Volkoff, H., 2016. The neuroendocrine regulation of food intake in fish: a review of current knowledge. *Front. Neurosci.* 10, 1–31. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00540>.
- Volkoff, H., Canosa, L.F., Unniappan, S., Cerda-Reverter, J.M., Bernier, N.J., Kelly, S.P., Peter, R.E., 2005. Neuropeptides and the control of food intake in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142, 3–19. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2004.11.001>.
- Witek, B., Ochwanowska, E., Rafay, J., Kolataj, A., Chrenek, P., Suvegova, K., 2005. Effect of ghrelin on activities of some lysosomal hydrolases in rabbits - PubMed. *Neuro Endocrinol. Lett.* 4, 397–400.
- Yuan, X., Cai, W., Liang, X.-F., Su, H., Yuan, Y., Li, A., Tao, Y.-X., 2015. Obestatin partially suppresses ghrelin stimulation of appetite in “high-responders” grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 184, 144–149. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.02.019>.
- Yúfera, M., Moyano, F.J., Astola, A., Pousao-Ferreira, P., Martínez-Rodríguez, G., 2012. Acidic digestion in a teleost: postprandial and circadian pattern of gastric pH, pepsin activity, and pepsinogen and proton pump mRNAs expression. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033687>.
- Yúfera, M., Romero, M.J., Pujante, I.M., Astola, A., Mancera, J.M., Sánchez-Vazquez, F. J., Moyano, F.J., Martínez-Rodríguez, G., 2014. Effect of feeding frequency on the daily rhythms of acidic digestion in a teleost fish (*Gilthead seabream*), 31, pp. 1024–1033. <https://doi.org/10.3109/07420528.2014.944265>.
- Zhong, H., Hu, Y., Yu, F., 2021. A review on ghrelin and fish reproduction. *Reprod. Breed.* 1, 128–135. <https://doi.org/10.1016/J.REPBRE.2021.07.004>.
- Zhou, C., Zheng, J., Lei, L., Yuan, D., Zhu, C., Ye, H., Zhang, C., Wang, D., Yang, M., Wu, J., Zhu, L., Zeng, B., 2016. Evidence that ghrelin may be associated with the food intake of gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). *Fish Physiol. Biochem.* 42, 1637–1646. <https://doi.org/10.1007/s10695-016-0246-y>.

16. DISCUSION GENERAL

Tal como se estableció en los objetivos de la investigación, la discusión general se enfocará en el interés para caracterizar las secuencias de los transcritos de leptina y grelina, y sus receptores de *C. gilberti*, así como el análisis de la expresión génica de ambas proteínas en tejidos de los peces sometidos diferentes densidades de cultivo y diferentes condiciones de hipoxia. Para lo cual se abordará en consideración de los principales resultados.

16.1 Caracterización de leptina y grelina de *C. gilberti*

La caracterización de leptina se llevó a cabo mediante al alineamiento de secuencias de aminoácidos comparado con otras especies de teleósteos; cuyas secuencias conservadas muestra el péptido señal, manteniendo la estructura de cuatro hélices (A, B, C y D) que forman la estructura de dicha proteína, así mismo, disponen de dos residuos de cisteína altamente conservados. De forma análoga, en leptina de mamíferos, estos residuos de cisteína establecen un puente disulfuro que conecta los extremos C-terminales de la hélice C y la hélice D (Denver et al., 2011; Wen et al., 2020).

Por otra parte, en los resultados filogenéticos para leptina se pudo constatar el agrupamiento de *C. gilberti* con alta similitud con corvina amarilla (*L. crocea*), y corvina Huáng gū yú (*Nibeia albiflora*) en un mismo clado, todas ellas pertenecientes a la familia Sciaenidae.

En otros estudios, mediante análisis filogenético en otros peces teleósteos también se ha podido corroborar el alto grado de conservación de la secuencia de aminoácidos de la leptina entre varias especies de peces marinos (H. Zhao et al., 2015; Gorissen y Flik, 2014).

La caracterización de la secuencia y la expresión transcripcional de la leptina en *C. gilberti*, es fundamental en la regulación de la ingesta de alimentos y el balance energético en vertebrados (Hussain y Khan, 2017).

Mientras que leptina de peces conserva el par de residuos de cisteína que forman el puente disulfuro, es de destacar que carecen del motivo de seis residuos GLDFIP (posición 38-43 en la leptina humana) completamente conservado entre los tetrápodos y necesario para la activación del receptor de leptina (Denver et al., 2011).

Para el caso de grelina, se realizó con el propéptido maduro de *C. gilberti*, comparado con teleósteos homólogos, el cual mostró alta conservación de los sitios de escisión enzimática en las diferentes especies de teleósteos, dando lugar a los péptidos bioactivos maduros de grelina con 21 residuos de longitud.

Mediante filogenia se pudo comprobar la similitud que existe entre *C. gilberti* con corvina amarilla (*L. crocea*) y corvina amarilla (*Nibeia albiflora*), agrupadas en el mismo clado, todas ellas pertenecientes a la familia Sciaenidae (Figura 19). Esto comprueba los niveles de conservación de secuencias mostradas en el alineamiento múltiple.

La grelina de *C. gilberti*, conserva una señal de amidación del extremo carboxilo-terminal, caracterizada por tener una glicina, seguida de un residuo básico de arginina.

En mamíferos y teleósteos, existe una característica única del péptido maduro de grelina, es la modificación de Ser-3 con ácido graso, principalmente ácido octanoico (Kaiya et al., 2008); Kojima y Kangawa, 2005; Nishi et al., 2011). De este modo, los cuatro aminoácidos N-terminales de grelina de teleósteos, incluyendo grelina de *C. gilberti*, está altamente conservada (Figura 4).

Estos residuos fueron reconocidos como el "núcleo activo" de grelina, ya que son esenciales para la unión al receptor (Kaiya et al., 2008). La estructura amida en el C-terminal, fue identificada por primera vez en grelina de la anguila japonesa (*Anguilla japonica*), la cual aún no se ha observado en grelina de mamíferos (Kaiya et al., 2003b; Kaiya et al., 2008a). Por otra parte, la amidación de la grelina en los peces tiene importancia fisiológica en su bioactividad, ya que los péptidos amidados son menos sensibles a la degradación proteolítica, lo que prolonga su vida media en el torrente sanguíneo (Kumar et al., 2014), dado que la hormona grelina, una molécula descrita en otras especies de peces, como clave en el control del apetito (Bertucci et al., 2019; Jönsson, 2013).

16.2 Expresión basal de ARNm de leptina y grelina de *C. gilberti*

El análisis de los niveles transcripcionales basales de leptina en *C. gilberti*, se pudo demostrar una mayor expresión génica a nivel hepático, hasta 50 veces superior a los demás tejidos analizados ($p < 0,05$), seguida por músculo blanco, y niveles significativamente más bajos en riñón anterior y posterior, cerebro, bazo y branquias ($p < 0,05$), y con menor expresión los ciegos pilóricos, estómago e intestino anterior y posterior.

Otros estudios con la misma especie sometidos a condiciones normóxicas e hipoxias intermitentes, obtuvieron resultados similares relacionados a expresión de leptina en tejidos de peces con peso corporal medio de 358 g, de una población, con una densidad de 25 Kg/m³. En ambos casos, la mayor expresión se observó a nivel de hígado, seguido del músculo (Álvarez et al., 2020).

Los resultados de este estudio indican que los juveniles de un año mostraron mayor expresión relativa del transcrito cgLep a nivel hepático, lo que concuerda con lo observado por Michel et al., (2016) en su investigación con pez cebra (*Danio rerio*), donde tanto la leptina como su receptor se expresaban predominantemente en el mismo órgano. Otros estudios con teleósteos, incluidos los de Tinoco et al., (2014); Gorissen y Flik, (2014); (Trombley et al., 2012), señalan que los niveles de especialización que tiene el hígado en la producción de la hormona leptina, mientras que en

mamíferos, la expresión de leptina se da principalmente en el tejido adiposo, la cual es mínima en peces teleósteos (Blanco y Soengas, 2021).

Es notable que los niveles de expresión de la leptina en músculo son muy similares a los detectados en el hígado; y de manera similar los niveles de expresión basal del receptor, lo que sugiere sugieren que la leptina probablemente desempeña un papel importante en el equilibrio energético muscular de *C. gilberti*, ya que también se han observado patrones similares leptina en pez arroz japonés (*Oryzias latipes*), en los que se encontró una mayor expresión génica a nivel muscular (Kurokawa y Murashita, 2009).

Aunque el mecanismo regulador de la expresión génica de la leptina no está muy claro, sigue, se sabe que es una hormona fundamental que rige la homeostasis de la glucosa y los triacilglicéridos (TAG) (Yan, Chen, Chen, Tang, et al., 2016). De igual manera Zhang y Chua, (2018), afirma que las variaciones en el estado nutricional provocan cambios en la secreción de leptina, que sirve como señal para la modulación de las reservas de triglicéridos, incluso en especies no mamíferas.

En cuanto a su receptor, cgLepR, los niveles transcripcionales basales aparecen notablemente más elevados en músculo blanco, con niveles medios arriba de 300 veces superiores a los de otros tejidos ($p < 0,05$), luego, en un nivel mucho más bajo de expresión génica en riñón anterior y posterior, así como a nivel hepático. Por el contrario, los niveles de expresión más bajos se observan en ciegos pilóricos, estómago e intestino anterior y posterior.

La mayor expresión de receptores de leptina en este tejido apunta a un posible papel regulador en el almacenamiento de grasa muscular, no obstante, es indispensable seguir investigando para el medir impacto de la leptina en el metabolismo lipídico del músculo de *C. gilberti*. Estos hallazgos implican una función conservada de la leptina en todos los teleósteos, centrada principalmente en la movilización de moléculas energéticas (Chen et al., 2020). Además, es probable que la leptina influya en la ingesta de alimentos y la regulación del peso corporal, así como en la adaptación a niveles bajos de oxígeno, en entornos acuáticos (Gorissen y Flik, 2014).

Por otra parte, la expresión basal de ARNm de grelina en *C. gilberti* se detectó en siete tejidos (branquias, ciegos pilóricos, estómago, hígado, intestino, musculo y bazo); y la mayor expresión ARNm se registró a nivel del estómago, seguido del músculo, mientras que la expresión más baja se encontró en el hígado y el bazo ($p > 0,05$), resultado similar al reportado por Liu et al. (2021), para corvina *L. crocea*, la cual está estrechamente relacionada con la corvina *C. golberti*; sin embargo, se han descrito diferentes niveles de expresión del transcrito de grelina en otras especies de peces como en la carpa gibelio (*Carassius auratus gibelio*), con una elevada expresión de grelina

en el tracto intestinal, seguido del hígado. En contraste, se observó una baja expresión en el corazón, cerebro, piel, músculos branquias y ojos (Kitazawa y Kaiya, 2019); Zhou et al., 2016).

Estos hallazgos sugieren que la grelina puede contribuir a la función orexigénica periférica en los tejidos digestivos de las corvinas; además, la presencia de otro GHS-R, denominado GHS-R2a, en el pez cebra, bagre y pez dorado, muestran similitud a la secuencia de aminoácidos con GHSR1a (Kaiya et al., 2010; Small et al., 2019). De acuerdo con el análisis de genes, el ARNm del GHS-R se produce en muchos tejidos de corvina *C. gilberti*, incluidos aquellos importantes en la regulación periférica y de regulación central de la alimentación, por ejemplo, cerebro, hígado y tracto gastrointestinal.

Finalmente se puede decir que existe un rol antagónico entre ambas hormonas (Leptina y Grelina), lo cual se muestra en un estudio realizado por Dar et al., (2018), mediante la evaluación de la expresión génica de ambas hormonas sobre el efecto de la inanición del pez rou (*Labeo roita*), sometido a 7 y 15 días de inanición. Los resultados mostraron que los niveles de expresión del gen de grelina aumentaron significativamente ($P < 0,05$) hasta el séptimo día y disminuyeron después de la reanimación; mientras que los niveles de leptina mostraron la tendencia opuesta con la disminución de los niveles de expresión durante el hambre y disminuyeron a los niveles de control después de la realización.

16.3 Expresión basal de ARNm del receptor de leptina (Lep-R) y receptor de grelina (GHS-R) en tejidos de *C. gilberti*

En cuanto a los resultados en los niveles transcripcionales basales de leptina en juveniles de *C. gilberti*, se puede afirmar que mayor a nivel hepático, hasta 50 veces superior a los demás tejidos analizados ($p < 0,05$), seguida por el músculo blanco, y niveles significativamente más bajos en riñón anterior y posterior, cerebro, bazo y branquias, y con menor expresión a nivel de ciegos pilóricos, estómago e intestino anterior y posterior. Estos resultados concuerdan con lo observado por Michel et al., (2016) en su investigación con pez cebra (*Danio rerio*), donde tanto la leptina como su receptor se expresaban predominantemente en el mismo órgano. Otros estudios con teleósteos, incluidos los de Tinoco et al., (2014); Gorissen y Flik, (2014); (Trombley et al., 2012), subrayan sobre los niveles de especialización del hígado en la producción de la hormona leptina. Sin embargo, a diferencia de los mamíferos, la expresión de leptina en el tejido adiposo de los peces teleósteos es mínima (Blanco y Soengas, 2021). Históricamente, se creía que estas células

de peces no producían la hormona (Kurokawa y Murashita, 2009), aunque la investigación de Salmerón et al. (2015) realizadas con trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), demostraron que el tejido adiposo de los teleósteos tiene la capacidad de producir leptina, aunque a niveles más bajos en comparación con vertebrados superiores; de igual manera, Won et al., (2016) sugieren que, en teleósteos, la leptina se expresa principalmente en el hígado, ya que este tejido es responsable del almacenamiento de energía en los peces, que incluye lípidos, que cumplen una función similar a la de los depósitos de grasa de los mamíferos.

En relación a la expresión relativa de ARNm del receptor de grelina, conocido como hormona del crecimiento (GHS-R) en los tejidos: estómago, hígado, ciegos pilóricos, intestino, y musculo, mostraron mayores niveles de expresión a nivel de estómago y ciegos pilóricos, con niveles más bajos en los demás tejidos. Estos hallazgos sugieren que la grelina puede contribuir a la función orexigénica periférica en los tejidos digestivos de las corvinas *C. gilberti*, ya que la actividad biológica se deriva de su capacidad para unirse y activar los receptores GHS-R, descritos como receptores secretagogos de la hormona del crecimiento (Kaiya et al., 2010). Ya que la grelina interviene en la regulación de numerosas funciones fisiológicas, incluida la regulación de la síntesis de GHS-R y la ingesta de alimentos en los mamíferos, aunque recientemente se ha identificado el gen y las estructuras peptídicas de la grelina en varias especies de peces (Unniappan y Peter, 2005)

En vertebrados se han descrito dos GHS-R, uno es un receptor funcional acoplado a proteína G con siete dominios transmembrana, denominado GHS-R1a, mientras que el otro es una forma corta del GHS-R1a, que carece del dominio transmembrana 5, denominada GHS-R1b (Albarrán-Zeckler y Smith, 2013). Diferentes autores han informado sobre estas isoformas GHS-R en peces teleósteos, el pez dorado (*Carassius auratus*) y el pez cebra (*Danio rerio*) (Blanco et al., 2016; Kaiya et al., 2013b; Perelló-Amorós et al., 2019).

Es importante señalar que la funcionalidad del GHS-R de los peces teleósteos se ha confirmado mediante la cuantificación del Ca^{2+} intracelular cuando células humanas transfectadas con el receptor, son estimuladas por grelina de bagre y mediante el uso del antagonista de la grelina [D-Lys3]-GHRP-6 (Nisembaum, et al., 2014; Small et al., 2019).

En cuanto al receptor de leptina (Lep-R), los niveles transcripcionales basales fueron notablemente más elevados en músculo blanco, hasta 300 veces por encima de los de otros tejidos ($p < 0,05$), con niveles más bajos en riñón (anterior y posterior), seguidos por hígado, ciegos pilóricos, estómago e intestino anterior y posterior (Figura 21). Estos, receptores de leptina se encuentran en múltiples tejidos periféricos y centrales, especialmente en poblaciones neuronales

hipotalámicas, y la señalización central actúa como un control indirecto para modular la inhibición de la alimentación, lo cual ha contribuido a identificar y caracterizar cómo la leptina contribuye al control central de la ingesta de alimentos (Schwartz et al., 2013). En mamíferos, el sitio de unión entre la leptina y su receptor está muy conservado (Prokop et al., 2012). Estudios realizados por Murashita, et al. (2021), sugieren influencia del receptor de leptina en los procesos fisiológicos implicados en la adquisición de nutrientes, principalmente en el control de la ingesta de alimentos y la digestión, metabolismo, la asignación de energía y el crecimiento.

16.4 Expresión de leptina (hígado) y grelina (estómago) de *C. gilberti* a nivel pre y posprandial

Los resultados obtenidos para leptina bajo diferentes condiciones de alimentación (preprandial y posprandial) indicaron valores bajos durante el periodo preprandial, con un aumento significativo después de 1 hora después de alimentarse, seguido de un descenso a 6 horas posprandial.

Según Huising et al., 2006, los ritmos de alimentación desempeñan un papel crucial en el metabolismo de los peces, mediante la regulación del crecimiento y apetito. Por el contrario, Lep-R a nivel cerebral, mostró un aumento significativo durante el preprandial, con descensos notables 1 y 6 horas posprandiales; sin embargo, los niveles de expresión para no se observaron cambios a nivel de expresión génica a nivel del estómago.

Los resultados de leptina en *C. gilberti* sugiere que su actividad biológica es principalmente a nivel del estómago, promoviendo el apetito, mientras que su receptor (Lep-R) tiene actividad biológica principalmente a nivel cerebral.

La leptina tiene una participación sumamente importante en la regulación del gasto energético en los peces, y responde a una variedad de estresores, ya que a menudo los peces recurren a la reducción de la ingesta de alimentos como mecanismo de adaptación ante estresores recurrentes (Mankiewicz et al., 2021); Parker y Cheung, 2020). Entre estos factores de estrés, la hipoxia surge como una amenaza crítica, derivada de saturación inadecuada de oxígeno en los entornos acuáticos, especialmente en los sistemas de acuicultura intensiva. Por lo tanto, es razonable inferir que las hormonas que rigen la ingesta de alimentos podrían sufrir alteraciones bajo tales circunstancias ambientales (Conde-sieira y Soengas, 2017; Salmerón et al., 2015).

En relación a la expresión relativa de ARNm de grelina en estómago de *C. gilberti* fueron mayores a nivel preprandial, con una disminución 1 hora posprandial, y con un incremento gradual

6 horas posprandial, lo que sugiere que dicha hormona está asociada con el apetito de los peces, coincidiendo con Zhou et al. (2016), quien encontró que los peces teleósteos sometidos a periodos de ayuno prolongado incrementan significativamente la síntesis de grelina en su estómago o intestino. En el caso de la grelina de vertebrados, existen cantidades mucho mayores de DacilGrelina que de acilGrelina en la sangre, donde más del 90% de la inmunorreactividad para la grelina es para la forma no acilada, tanto en ratas como en humanos (Nishi et al., 2011).

La grelina se considera un péptido intestino-cerebral, ampliamente distribuidas por todo el tracto gastrointestinal, y se producen en abundancia en las células endocrinas de la mucosa gastrointestinal, las cuales, son más abundantes en el estómago y se localizan en las capas de la mucosa gástrica (Sakata y Sakai, 2010). El área hipotalámica del cerebro está asociada a la regulación de la ingesta de alimentos, mientras que otros lugares fuera del hipotálamo también participan en esta función, también involucra la hormona del crecimiento en el comportamiento alimentario (Lin et al., 2000).

Al igual que en ratones, los mecanismos celulares para la detección de nutrientes se expresan de forma específica para cada región en el estómago, y en las células gástricas de grelina. Estos quimiosensores gástricos pueden desempeñar un papel modulador de las respuestas gastrointestinales, como la inhibición de la secreción de grelina tras la ingesta de alimentos (Nunez-Salces et al., 2020).

Entre los teleósteos, la expresión de ARNm de grelina se ha analizado en peces de colores (Unniappan y Peter, 2005) tilapia de Mozambique, *Oreochromis mossambicus* (Kaiya et al., 2003c), tilapia del Nilo, *Oreochromis niloticus* (Parhar et al., 2003), trucha arco iris, *O. mykiss* (Jönsson et al., 2010), salmón atlántico, *Salmo salar* (Murashita et al., 2009; Del Vecchio et al., 2021), carpa gibelio, *Carassius auratus gibelio* (Zhou et al., 2016), carpa herbívora, *Ctenopharyngodon idellus* (Liang et al., 2019) y corvina amarilla grande *Larimichthys crocea* (Huang et al., 2020).

16.5 Propiedades anorexigénicas de leptina y orexigénicas de grelina de *C. gilberti*

Los resultados mostraron un rápido aumento en los niveles de leptina a las 2 horas de exposición a hipoxia aguda, seguida de un retorno a los niveles de normoxia después de 6 horas, y esta respuesta persiste con exposición continuada a la hipoxia a largo plazo; ya que en hipoxia

intermitente, los peces sometidos a 30 días en las mismas condiciones hipóxicas, mostraron niveles de leptina en hígado similares a los de los individuos mantenidos en condiciones normoxicas; lo que sugiere que esta especie posee adaptaciones fisiológicas que le permiten responder eficazmente cuando los niveles de oxígeno disminuyen en el agua de mar (Álvarez et al., 2020).

De hecho, se considera que los teleósteos son más flexibles a la hora de cambiar su metabolismo con respecto a los mamíferos, considerando que esta es una hormona verdaderamente pleiotrópica, tanto en peces como en mamíferos con diversas funciones, entre otras la regulación de la ingesta de alimentos, el desarrollo y el peso corporal, así como la regulación del eje del estrés y los procesos de aclimatación a bajos niveles de oxígeno en el agua (Gorissen y Flik, 2014). En concreto, la regulación al aumento de leptina hepática se produce sólo durante episodios agudos de hipoxia, volviendo rápidamente a los niveles basales cuando se restablecen las condiciones normóxicas, lo que indica, que *C. gilberti* bajo condiciones de hipoxia, demuestran considerable resiliencia.

Estudios en otras especies como trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), sugieren que la acción anorexigénica de leptina está mediada a través de la estimulación de los neuropéptidos anorexígenos Pomc y Cart (Gong et al., 2016).

Por otro lado, al analizar los estados pre y posprandiales en juveniles de *C. gilberti*, revela una relación dinámica entre los niveles transcripcionales de leptina hepática y la disponibilidad de TAG y glucosa, en particular dos horas después de la ingestión, cuando los niveles de TAG y glucosa alcanzan su punto máximo, observamos un aumento simultáneo de los niveles de expresión de leptina hepática. Dado que los peces altamente activos, como la corvina, almacenan predominantemente lípidos en forma de TAG en el tejido muscular, la mayor expresión de receptores de leptina en este tejido apunta a un posible papel regulador en el almacenamiento de grasa muscular; no obstante, es indispensable seguir investigando para definir el impacto de la leptina en el metabolismo lipídico del músculo de *C. gilberti*. (McClelland et al., 1995)

Aunque el mecanismo regulador preciso de la expresión génica de la leptina sigue siendo difícil de alcanzar, se reconoce ampliamente que es una hormona fundamental que gobierna la homeostasis de la glucosa y los triacilglicéridos (TAG) (Yan et al., 2016 ; Zhang y Chua, 2018). también los autores consideran que las fluctuaciones en el estado nutricional generan variaciones en la secreción de leptina, que sirve como señal crucial para la modulación de las reservas de triglicéridos, incluso en especies no mamíferas.

Estos hallazgos implican una función conservada de la leptina en todos los teleósteos, centrada principalmente en la movilización de moléculas energéticas (Chen et al., 2020).

Así mismo, los resultados obtenidos relativos a la densidad de cultivo, se pudo demostrar que a la densidad más baja (15 Kg/m³), se pudo observar una variabilidad individual en los niveles de expresión génica de leptina hepática, comparados con aquellos criados a densidades de 25 y 35 Kg/m³.

Lo antes señalado confirma que la densidad de población es otro factor importante que puede provocar respuestas de estrés en granjas piscícolas, ya que puede influir en el crecimiento, el bienestar y el comportamiento dentro de las jaulas, tomando en cuenta que en acuicultura, garantizar el bienestar de los peces es primordial para mejorar las tasas de crecimiento (Zhang et al., 2022). Sin embargo, es necesario analizar el comportamiento de cada especie, ya que en salmón del atlántico (*Salmo salar*), se observó un efecto contrario, en el que las altas densidades de población (superiores a 20 kg/m³) desencadenaron síntesis de moléculas asociadas a la inhibición del apetito, como la leptina (Álvarez et al., 2022), fenómeno que podría atribuirse a la regulación de las señales de inhibición de la ingesta dentro del sistema nervioso central. Varios estudios indican que la leptina desempeña un papel en la modulación de procesos neuroendocrinos relacionados con las respuestas adaptativas y el comportamiento (Copeland et al., 2011); Gorissen y Flik, 2014).

También hay que señalar que la leptina tiene importante participación en la regulación del gasto energético en los peces, para responder a una variedad de estresores, mediante la reducción de la ingesta de alimentos como mecanismo de adaptación (Mankiewicz et al., 2021); Parker y Cheung, 2020)

Estudios realizados por Dar et al. (2018), revelaron el papel orexigénico de la grelina y anorexigénico de la leptina durante periodos de hambre y realimentación en el pez rou (*L. rohita*), para mantener la homeostasis energética mediante la regulación del metabolismo de los nutrientes. La pérdida de grelina sugiere que otros genes, como la motilina, podrían desempeñar un papel similar al de la grelina (Lie et al., 2018).

Así mismo, otros estudios sugieren que la grelina contienen ácido octanoico en Ser3 aumenta la bioactividad, la cual es conservada en teleósteos. No obstante, la grelina no acilada de *C. gilberti* también fue capaz de aumentar el apetito en un nivel más bajo que la acilada. A pesar de que Hosoda et al. (2000); Zhong et al. (2021) proponen que las funciones de la grelina no acilada en peces teleósteos son relativamente escasas, pue en visión generalizada, la grelina no acilada no

interactúa con GHS-R; por lo tanto, no tendría una función biológica similar a su homóloga acilada; por ello, algunos autores la califican de inactiva y que por tanto no ejerce acción orexigénica, tal como es el caso de la grelina no acilada del pez dorado (*Carassius auratus*), que no tiene la capacidad de inducir la ingesta de alimento (Blanco et al., 2016; Matsuda et al., 2006).

Otros estudios en vertebrados revelan que la grelina no acilada puede aumentar la ingesta de alimentos a un nivel inferior que la forma acetilada (Toshinai et al., 2006). Así mismo, la aplicación exógena de esta forma molecular aumentó la expresión del neuropéptido Y y la orexina, ambos neuropéptidos reconocidos como potentes orexígenos (Toshinai et al., 2006). Sin embargo, se pierde la capacidad de promover la síntesis de GHS-R, debido a lo cual, algunos autores han propuesto que la grelina no acilada debería considerarse una hormona distinta de la grelina acilada, porque podría inducir la ingesta de alimentos por un mecanismo independiente del receptor secretagogo de la hormona del crecimiento (Zhong et al., 2021). Cabe señalar que no se ha descrito ningún receptor específico para esta forma molecular de la grelina, por lo tanto, el papel potencial, los mecanismos de acción y la importancia funcional de la grelina no acilada, aun no se han establecido (Fernández et al., 2016). Esto es aún es menos conocido en peces teleósteos, por lo que es necesario seguir avanzando en estudios dosis-respuesta para evaluar las propiedades funcionales de ambas formas moleculares de grelina en sciaénidos y otros peces teleósteos.

17. CONCLUSIONES

Mediante esta investigación se logró identificar y caracterizar los péptidos anorexigénico **leptina**, orexigénico **grelina** en corvina *Cilus gilberti*.

El análisis de la secuencia de aminoácidos de la leptina en *C. gilberti* (cgLep) ha revelado un alto grado de conservación tanto en su secuencia como en su estructura, cuando se compara con homólogos de otras especies de peces teleósteos. Además, cgLep se expresa predominantemente en los tejidos hepáticos y musculares de los juveniles de *C. gilberti*. También, se observó que la expresión del gen cgLep aumentó en respuesta al balance energético posprandial y en entornos con densidades de población inferiores a 25 kg/m³. Este último hallazgo es particularmente importante, ya que sugiere posibles alteraciones en el comportamiento alimentario debido a señales de saciedad aumentadas como resultado de cambios en el comportamiento de los peces.

De igual manera, los análisis de la expresión de cgLep en condiciones de hipoxia mostraron importante nivel de resiliencia de esta especie a entornos con baja disponibilidad de oxígeno. En concreto, la regulación al alza de cgLep hepática se produjo sólo durante episodios agudos de

hipoxia, volviendo rápidamente a los niveles basales cuando se restablecen las condiciones normóxicas.

Por otra parte, los resultados de este estudio, pueden contribuir en la formulación de buenas prácticas asociadas al cultivo industrial de *C. gilberti*, ya ambos péptidos están asociados antagónicamente con los niveles de ingesta y aprovechamiento de los nutrientes en la dieta. Así mismo, podrían convertirse en biomarcadores para el monitoreo en el desarrollo y crecimiento de la corvina chilena.

También, se logró identificar y caracterizar el péptido orexigénico grelina en corvina *Cilus gilberti*, mostrando que la secuencia del péptido grelina está altamente conservada entre peces teleósteos, especialmente en el núcleo activo del extremo N-terminal. También, se puede puntualizar que la grelina de *C. gilberti* se expresa en principalmente en el estómago y en menor medida en otros tejidos del tracto gastrointestinal, lo que sugiere que la grelina podría estar involucrada en otras funciones fisiológicas en el proceso digestivo de estos órganos.

Al observar los perfiles de expresión del ARNm de la grelina durante los periodos pre y posprandial, se puede concluir que la grelina puede ser un inductor del apetito en esta especie. Además, los resultados de los estudios in vivo confirman la bioactividad orexigénica, indican que las formas moleculares de la grelina aumentan la ingesta de alimento, e interactúan localmente con los tejidos digestivos en *C. gilberti*. Este primer estudio con péptidos reguladores de esta especie proporciona una base para futuras investigaciones sobre los mecanismos reguladores y las funciones que desencadenan el papel de los péptidos orexigénicos en especies acuícolas de esciénidos.

Así mismo, los resultados de los estudios realizados in vivo, confirman la bioactividad orexigénica, indicando que las formas moleculares de grelina aumentan la ingesta de alimento e interactúan localmente con los tejidos digestivos de *C. gilberti*, proporcionando así una base para futuras investigaciones sobre los mecanismos reguladores y las funciones que desencadenan el papel de los péptidos orexigénicos en especies acuícolas de sciaénidos.

18. REFERENCIAS

Adams, C., Bron, J., Huntingford, F., Turnbull, J., & Bell, A. (2005). Stocking density and welfare of cage farmed Atlantic salmon: application of a multivariate analysis. *Aquaculture*, 243(1–4), 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.09.022>

- Ahima, R. S., & Osei, S. Y. (2004). Leptin signaling. *Physiology and Behavior*, *81*(2), 223–241. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.02.014>
- Aksakal, E., & Ekinçi, D. (2021). Effects of hypoxia and hyperoxia on growth parameters and transcription levels of growth, immune system and stress related genes in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology*, *262*. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.111060>
- Albarrán-Zeckler, R. G., & Smith, R. G. (2013). The ghrelin receptors (GHS-R1a and GHS-R1b). In *The Ghrelin System* (Vol. 25, pp. 5–15). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000346042>
- Allen, P. J., Brokordt, K., Oliva, M., Alveal, K., Flores, H., & Álvarez, C. A. (2021). Physiological insights for aquaculture diversification: Swimming capacity and efficiency, and metabolic scope for activity in cojinoba *Seriola lalandi*. *Aquaculture*, *531*(September 2020), 735968. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735968>
- Álvarez, C. A., Alvarado, J. F., Farías, M., Cárcamo, C. B., Flores, H., Guzmán, F., Martín, S. S., Varas, J., Messina, S., Acosta, F., Sandoval, N., Vega, B., & Santana, P. A. (2023). First insights about orexigenic activity and gastrointestinal tissue localization of ghrelin from *Corvina* drum (*Cilus gilberti*). *Aquaculture*, *571*. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739468>
- Álvarez, C. A., Jerez-Cepa, I., Cárcamo, C. B., Toledo, P., Flores, H., & Brokordt, K. (2020). Growth performance, physiological responses to hypoxia and flesh quality of Chilean croaker (*Cilus gilberti*) stocked at different densities. *Aquaculture*, *525*. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735316>
- Álvarez, C. A., Santana, P. A., Cárcamo, C. B., Cárdenas, C., Morales-Lange, B., Ramírez, F., Valenzuela, C., Boltaña, S., Alcaíno, J., Guzmán, F., & Mercado, L. (2022). Effect of Fish Stock Density on Hormone Genes Expression from Brain and Gastrointestinal Tract of *Salmo salar*. *Animals*, *12*(9). <https://doi.org/10.3390/ani12091174>
- Assan, D., Huang, Y., Mustapha, U. F., Addah, M. N., Li, G., & Chen, H. (2021). Fish Feed Intake, Feeding Behavior, and the Physiological Response of Apelin to Fasting and Refeeding. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.798903>
- Audira, G., Sarasamma, S., Chen, J., Juniardi, S., Sampurna, B. P., Liang, S., Lai, Y., & Lin, G. (2018). *Zebrafish Mutants Carrying Leptin a (lepa) Gene Deficiency Display Obesity , Anxiety , Less Aggression and Fear , and Circadian Rhythm and Color Preference Dysregulation*. <https://doi.org/10.3390/ijms19124038>
- Bakshi, A., Singh, R., & Rai, U. (2022). Trajectory of leptin and leptin receptor in vertebrates: Structure, function and their regulation. In *Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology* (Vol. 257). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2021.110652>
- Béarez, P. (1995a). *Prehistoria de la costa extremo-sur del Perú*. <https://www.researchgate.net/publication/288635506>
- Béarez, P. (1995b). *Prehistoria de la costa extremo-sur del Perú*. <https://www.researchgate.net/publication/288635506>
- Bernier, N. J., Gorissen, M., & Flik, G. (2012). Differential effects of chronic hypoxia and feed restriction on the expression of leptin and its receptor, food intake regulation and the endocrine stress response in common carp. *Journal of Experimental Biology*, *215*(13), 2273–2282. <https://doi.org/10.1242/jeb.066183>
- Bernier, N. J., & Peter, R. E. (2001). The hypothalamic-pituitary-interrenal axis and the control of food intake in teleost fish. In *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* (Vol. 129).

- Bertucci, J. I., Blanco, A. M., Sundarajan, L., Rajeswari, J. J., Velasco, C., & Unniappan, S. (2019). *Nutrient Regulation of Endocrine Factors Influencing Feeding and Growth in Fish*. 10(February), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00083>
- Bhat, U. S., Shahi, N., Surendran, S., & Babu, K. (2021). Neuropeptides and Behaviors: How Small Peptides Regulate Nervous System Function and Behavioral Outputs. In *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.786471>
- Blanco, A. M., Gómez-Boronat, M., Redondo, I., Valenciano, A. I., & Delgado, M. J. (2016). Periprandial changes and effects of short- and long-term fasting on ghrelin, GOAT, and ghrelin receptors in goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 186(6), 727–738. <https://doi.org/10.1007/s00360-016-0986-0>
- Blanco, A. M., Sánchez-Bretaña, A., Delgado, M. J., & Valenciano, A. I. (2016). Brain Mapping of Ghrelin O-Acyltransferase in Goldfish (*Carassius Auratus*): Novel Roles for the Ghrelinergic System in Fish? *Anatomical Record*, 299(6), 748–758. <https://doi.org/10.1002/ar.23346>
- Blanco, A. M., & Soengas, J. L. (2021). Leptin signalling in teleost fish with emphasis in food intake regulation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 526. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2021.111209>
- Bodas, D. S., Maduskar, A., Kaniganti, T., Wakhloo, D., Balasubramanian, A., Subhedar, N., & Ghose, A. (2023). Convergent Energy State-Dependent Antagonistic Signaling by Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript (CART) and Neuropeptide Y (NPY) Modulates the Plasticity of Forebrain Neurons to Regulate Feeding in Zebrafish. *Journal of Neuroscience*, 43(7), 1089–1110. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2426-21.2022>
- Bommarito, P. A., & Fry, R. C. (2018). The role of DNA methylation in gene regulation. In *Toxicoepigenetics: Core Principles and Applications* (pp. 127–151). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812433-8.00005-8>
- Bonilla, E., Párraga, M., López, L. A., Escolar, F., & del Mazo, J. (2002). Cuantificación de la expresión génica a partir de un número limitado de células mediante RT-PCR en tiempo real. *Bioquímica*, 27(Pl 960183), 2–6.
- Butler, J. M., Herath, E. M., Rimal, A., Whitlow, S. M., & Maruska, K. P. (2020). Galanin neuron activation in feeding, parental care, and infanticide in a mouthbrooding African cichlid fish. *Hormones and Behavior*, 126. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2020.104870>
- Carbonara, P., Dioguardi, M., Cammarata, M., Zupa, W., Vazzana, M., Spedicato, M. T., & Lembo, G. (2019). Basic knowledge of social hierarchies and physiological profile of reared sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *PLoS ONE*, 14(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208688>
- Cárdenas, S. (2011). *Cultivo de corvina (Argyrosomus regius)*. *Serie de cuadernos de acuicultura n° 3*. January 2011, 65.
- Cárdenas, S. (2012). Biología y acuicultura de corvinas en el mundo. *AquaTIC*, 37(Naca 2006), 1–13.
- Cardoso, J. C. R., Bergqvist, C. A., & Larhammar, D. (2020). Corticotropin-Releasing Hormone (CRH) Gene Family Duplications in Lampreys Correlate With Two Early Vertebrate Genome Doublings. *Frontiers in Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00672>
- Cavagnari, B. M. (2012). Regulación de la expresión génica: Cómo operan los mecanismos epigenéticos. *Archivos Argentinos de Pediatría*, 110(2), 132–136. <https://doi.org/10.5546/aap.2012.132>

- Chauhan, T., & Rajiv, K. (2010). Molecular markers and their applications in fisheries and aquaculture. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 01(04), 281–291. <https://doi.org/10.4236/abb.2010.14037>
- Chen, H., Wang, B., Zhou, B., Qi, J., Tang, N., Wang, S., Tian, Z., Wang, M., Xu, S., Yu, N., Chen, D., Dawood, M. A. O., & Li, Z. (2020). Characterization, phylogeny, and responses of leptin to different nutritional states in critically endangered Yangtze sturgeon (*Acipenser dabryanus*). *Aquaculture*, 525. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735296>
- Chicas, F. A., González, J. A., & Ramírez, W. E. (2012). ECOLOGIA BASICA DE LOS PECES DEL GOLFO DE FONSECA. *ResearchGate*, December, 1–35.
- Chrousos, G. P. (2009). Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews Endocrinology*, 5(7), 374–381. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2009.106>
- Conde-Sieira, M., Chivite, M., Míguez, J. M., & Soengas, J. L. (2018). Stress effects on the mechanisms regulating appetite in teleost fish. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 9, Issue OCT). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00631>
- Conde-sieira, M., & Soengas, J. L. (2017). *Nutrient Sensing Systems in Fish : Impact on Food Intake Regulation and Energy Homeostasis*. 10(January), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00603>
- Copeland, D. L., Duff, R. J., Liu, Q., Prokop, J., & Londraville, R. L. (2011). Leptin in teleost fishes: An argument for comparative study. *Frontiers in Physiology*, JUN. <https://doi.org/10.3389/fphys.2011.00026>
- Dar, S. A., Srivastava, P. P., Varghese, T., Gupta, S., Gireesh-Babu, P., & Krishna, G. (2018a). Effects of starvation and refeeding on expression of ghrelin and leptin gene with variations in metabolic parameters in *Labeo rohita* fingerlings. *Aquaculture*, 484, 219–227. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.11.032>
- Dar, S. A., Srivastava, P. P., Varghese, T., Gupta, S., Gireesh-Babu, P., & Krishna, G. (2018b). Effects of starvation and refeeding on expression of ghrelin and leptin gene with variations in metabolic parameters in *Labeo rohita* fingerlings. *Aquaculture*, 484, 219–227. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.11.032>
- Dardzińska, J. A., Małgorzewicz, S., Kaska, Ł., Proczko, M., Stefaniak, T., Stankiewicz, M., & Ździński, Z. (2014). Fasting and postprandial acyl and desacyl ghrelin levels in obese and non-obese subjects. *Endokrynologia Polska*, 65(5), 377–381. <https://doi.org/10.5603/EP.2014.0052>
- Deck, C. A., Honeycutt, J. L., Cheung, E., Reynolds, H. M., & Borski, R. J. (2017a). Assessing the functional role of leptin in energy homeostasis and the stress response in vertebrates. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 8, Issue APR). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00063>
- Deck, C. A., Honeycutt, J. L., Cheung, E., Reynolds, H. M., & Borski, R. J. (2017b). Assessing the functional role of leptin in energy homeostasis and the stress response in vertebrates. *Frontiers in Endocrinology*, 8(APR). <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00063>
- Del Vecchio, G., Lai, F., Gomes, A. S., Verri, T., Kalanathan, T., Barca, A., Handeland, S., & Rønnestad, I. (2021). Effects of Short-Term Fasting on mRNA Expression of Ghrelin and the Peptide Transporters PepT1 and 2 in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Frontiers in Physiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.666670>
- Del Vecchio, G., Murashita, K., Verri, T., Gomes, A. S., & Rønnestad, I. (2021). Leptin receptor-deficient (knockout) zebrafish: Effects on nutrient acquisition. *General and Comparative Endocrinology*, 310. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2021.113832>
- Denver, R. J., Bonett, R. M., & Boorse, G. C. (2011). Evolution of leptin structure and function. *Neuroendocrinology*, 94(1), 21–38. <https://doi.org/10.1159/000328435>

- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J. F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J. M., & Gascuel, O. (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research*, 36(Web Server issue). <https://doi.org/10.1093/nar/gkn180>
- Diz-Chaves, Y. (2011). Ghrelin, appetite regulation, and food reward: Interaction with chronic stress. *International Journal of Peptides*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/898450>
- do Carmo Neves, L., Favero, G. C., Beier, S. L., Ferreira, N. S., Palheta, G. D. A., de Melo, N. F. A. C., & Luz, R. K. (2020). Physiological and metabolic responses in juvenile *Colossoma macropomum* exposed to hypoxia. *Fish Physiology and Biochemistry*, 46(6), 2157–2167. <https://doi.org/10.1007/s10695-020-00868-8>
- Este, O. C. S. A., Cualquier, O. C. S. A., & Controlada, C. N. O. (2011). *Manual Del*.
- FAO. (2017). *Planning for aquaculture diversification: the importance of climate change and other drivers. FAO Technical Workshop 23-25 June 2016. FAO Fisheries and aquaculture proceedings 47*.
- Farrell, A. P., & Richards, J. G. (2009). Chapter 11 Defining Hypoxia: An Integrative Synthesis of the Responses of Fish to Hypoxia. In *Fish Physiology* (1st ed., Vol. 27, Issue C). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)00011-3](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)00011-3)
- Feng, K. E., Zhang, G. U. I. R., Wei, K. A. I. J., & Xiong, B. X. I. (2013). *Molecular Cloning , Tissue Distribution , and Ontogenetic Expression of Ghrelin and Regulation of Expression by Fasting and Refeeding in the Grass Carp (Ctenopharyngodon idellus)*. <https://doi.org/10.1002/jez.1784>
- Fernández, C., & Oyarzún, C. (2001). Trophic variations of the Chilean croaker *Cilus gilberti* during the summer period 1997-98 (Perciformes, Sciaenidae). *Journal of Applied Ichthyology*, 17(5), 227–233. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0426.2001.00273.x>
- Fernandez, G., Cabral, A., Cornejo, M. P., De Francesco, P. N., Garcia-Romero, G., Reynaldo, M., & Perello, M. (2016). Des-Acyl Ghrelin Directly Targets the Arcuate Nucleus in a Ghrelin-Receptor Independent Manner and Impairs the Orexigenic Effect of Ghrelin. *Journal of Neuroendocrinology*, 28(2), 1–12. <https://doi.org/10.1111/jne.12349>
- Ferrari, M. C. O., Capitania-Kwok, T., & Chivers, D. P. (2006). The role of learning in the acquisition of threat-sensitive responses to predator odours. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 60(4), 522–527. <https://doi.org/10.1007/s00265-006-0195-z>
- Friedman, J. (2015a). Leptin and the regulation of food intake and body weight. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 61, S202. <https://doi.org/10.3177/jnsv.61.S202>
- Friedman, J. (2015b). Leptin and the regulation of food intake and body weight. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 61, S202. <https://doi.org/10.3177/jnsv.61.S202>
- Garcia-Suarez, O., Cabo, R., Abbate, F., Randazzo, B., Laurà, R., Piccione, G., Germanà, A., & Levanti, M. (2018). Presence and distribution of leptin and its receptor in the gut of adult zebrafish in response to feeding and fasting. *Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia*, 47(5), 456–465. <https://doi.org/10.1111/ahe.12384>
- Gavery, M. R., & Roberts, S. B. (2017). Epigenetic considerations in aquaculture. *PeerJ*, 2017(12). <https://doi.org/10.7717/peerj.4147>
- Giaquinto, D., De Felice, E., Attanasio, C., Palladino, A., Schiano, V., Mollo, E., Lucini, C., de Girolamo, P., & D'angelo, L. (2022). Central and Peripheral NPY Age-Related Regulation: A Comparative Analysis in Fish Translational Models. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7). <https://doi.org/10.3390/ijms23073839>
- Gilmour, K. M., & Bard, B. (2022). Social buffering of the stress response: Insights from fishes. *Biology Letters*, 18(10). <https://doi.org/10.1098/rsbl.2022.0332>

- Gjedrem, T., Robinson, N., & Rye, M. (2012). The importance of selective breeding in aquaculture to meet future demands for animal protein: A review. In *Aquaculture* (Vols. 350–353, pp. 117–129). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.008>
- Gong, N., & Björnsson, B. T. (2014). Leptin signaling in the rainbow trout central nervous system is modulated by a truncated leptin receptor isoform. *Endocrinology*, *155*(7), 2445–2455. <https://doi.org/10.1210/en.2013-2131>
- Gong, N., Jönsson, E., & Björnsson, B. T. (2016). Acute anorexigenic action of leptin in rainbow trout is mediated by the hypothalamic Pi3k pathway. *Journal of Molecular Endocrinology*, *56*(3), 227–238. <https://doi.org/10.1530/JME-15-0279>
- Gorissen, M., Bernier, N. J., Nabuurs, S. B., Flik, G., & Huising, M. O. (2009). Two different leptin paralogues in zebrafish (*Danio rerio*) that originate early in teleostean evolution. *Journal of Endocrinology*, *201*(3), 329–339. <https://doi.org/10.1677/JOE-09-0034>
- Gorissen, M., & Flik, G. (2014a). Leptin in teleostean fish, towards the origins of leptin physiology. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, *61–62*, 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2014.06.005>
- Gorissen, M., & Flik, G. (2014b). Leptin in teleostean fish, towards the origins of leptin physiology. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, *61–62*, 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2014.06.005>
- Gorissen, M., & Flik, G. (2016). The Endocrinology of the Stress Response in Fish: An Adaptation-Physiological View. In *Fish Physiology* (Vol. 35). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802728-8.00003-5>
- Grau, P. W. (2012). *El factor HIF-1 inducido por la hipoxia y la sensibilidad al oxígeno. Rol del hierro intracelular*. *16*(5), 773–785.
- Grone, B. P., Butler, J. M., Wayne, C. R., & Maruska, K. P. (2021). Expression patterns and evolution of urocortin and corticotropin-releasing hormone genes in a cichlid fish. *Journal of Comparative Neurology*, *529*(10), 2596–2619. <https://doi.org/10.1002/cne.25113>
- Haghparast, A., Fatahi, Z., Arezoomandan, R., Karimi, S., Taslimi, Z., & Zarrabian, S. (2017). Functional roles of orexin/hypocretin receptors in reward circuit. In *Progress in Brain Research* (Vol. 235, pp. 139–154). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2017.08.005>
- Haglund, E., Sułkowska, J. I., He, Z., Feng, G. S., Jennings, P. A., & Onuchic, J. N. (2012). The Unique Cysteine Knot Regulates the Pleiotropic Hormone Leptin. *PLoS ONE*, *7*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045654>
- Hong, W., & Zhang, Q. (2003). Review of captive bred species and fry production of marine fish in China. *Aquaculture*, *227*(1–4), 305–318. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00511-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00511-8)
- Hsuchou, H., He, Y., Kastin, A. J., Tu, H., Markadakis, E. N., Rogers, R. C., Fossier, P. B., & Pan, W. (2009a). Obesity induces functional astrocytic leptin receptors in hypothalamus. *Brain*, *132*(4), 889–902. <https://doi.org/10.1093/brain/awp029>
- Hsuchou, H., He, Y., Kastin, A. J., Tu, H., Markadakis, E. N., Rogers, R. C., Fossier, P. B., & Pan, W. (2009b). Obesity induces functional astrocytic leptin receptors in hypothalamus. *Brain*, *132*(4), 889–902. <https://doi.org/10.1093/brain/awp029>
- Huang, W., Yao, C., Liu, Y., Xu, N., Yin, Z., Xu, W., Miao, Y., Mai, K., & Ai, Q. (2020). Dietary Allicin Improved the Survival and Growth of Large Yellow Croaker (*Larimichthys crocea*) Larvae via Promoting Intestinal Development, Alleviating Inflammation and Enhancing Appetite. *Frontiers in Physiology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.587674>
- Huising, M. O., Geven, E. J. W., Kruiswijk, C. P., Nabuurs, S. B., Stolte, E. H., Spanings, F. A. T., Lidy Verburg-Van Kemenade, B. M., & Flik, G. (2006). Increased leptin expression in common carp (*Cyprinus carpio*) after food intake but not after fasting or feeding to satiation. *Endocrinology*, *147*(12), 5786–5797. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0824>

- Hussain, Z., & Khan, J. A. (2017). Food intake regulation by leptin: Mechanisms mediating gluconeogenesis and energy expenditure. In *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* (Vol. 10, pp. 940–944). Wolters Kluwer Medknow Publications. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.09.003>
- Hyeong-Kyu Park¹ and Rexford S. Ahima. (2014). *Leptin signaling*. 81(September), 223–241. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.02.014>
- Iliyasu, A., Mohamed, Z. A., & Terano, R. (2016). Comparative analysis of technical efficiency for different production culture systems and species of freshwater aquaculture in Peninsular Malaysia. *Aquaculture Reports*, 3, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2015.12.001>
- Israeli, D. (1996). Monitoring the behavior of hypoxia-stressed *Carassius auratus* using computer vision. *Aquacultural Engineering*, 15(6), 423–440. [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(96\)01009-6](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(96)01009-6)
- Jönsson, E. (2013). The role of ghrelin in energy balance regulation in fish. In *General and Comparative Endocrinology* (Vol. 187, pp. 79–85). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.03.013>
- Jönsson, E., Kaiya, H., & Björnsson, B. T. (2010). Ghrelin decreases food intake in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) through the central anorexigenic corticotropin-releasing factor system. *General and Comparative Endocrinology*, 166(1), 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.11.001>
- Jorgensen, E. H., Christiansen, J. S., & Jobling, M. (1993). *Effects of stocking density on food intake, growth performance and oxygen consumption in Arctic charr (Salvelinus alpinus)* (Vol. 24).
- Kaiya, H., Kangawa, K., & Miyazato, M. (2013). Molecular evolution of GPCRs: Ghrelin/ghrelin receptors. *Journal of Molecular Endocrinology*, 52(3). <https://doi.org/10.1530/JME-13-0175>
- Kaiya, H., Kojima, M., Hosoda, H., Riley, L. G., Hirano, T., Grau, E. G., & Kangawa, K. (2003). Amidated fish ghrelin: purification, cDNA cloning in the Japanese eel and its biological activity. In *Journal of Endocrinology* (Vol. 176). <http://www.endocrinology.org>
- Kaiya, H., Miura, T., Matsuda, K., Miyazato, M., & Kangawa, K. (2010). Two functional growth hormone secretagogue receptor (ghrelin receptor) type 1a and 2a in goldfish, *Carassius auratus*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 327(1–2), 25–39. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.06.004>
- Kaiya, H., Miyazato, M., & Kangawa, K. (2011). Recent advances in the phylogenetic study of ghrelin. In *Peptides* (Vol. 32, Issue 11, pp. 2155–2174). <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.04.027>
- Kaiya, H., Miyazato, M., Kangawa, K., Peter, R. E., & Unniappan, S. (2008a). Ghrelin: A multifunctional hormone in non-mammalian vertebrates. In *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* (Vol. 149, Issue 2, pp. 109–128). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.12.004>
- Kaiya, H., Miyazato, M., Kangawa, K., Peter, R. E., & Unniappan, S. (2008b). Ghrelin: A multifunctional hormone in non-mammalian vertebrates. In *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* (Vol. 149, Issue 2, pp. 109–128). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.12.004>
- Kalanathan, T., Gomes, A. S., Lai, F., Tolås, I., Jordal, A. E. O., Norland, S., Murashita, K., & Rønnestad, I. (2021). Brain Distribution of 10 cart Transcripts and Their Response to 4 Days of Fasting in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Frontiers in Marine Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.763766>

- Kang, K. S., Yahashi, S., & Matsuda, K. (2011). The effects of ghrelin on energy balance and psychomotor activity in a goldfish model: An overview. *International Journal of Peptides*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/171034>
- Karnatak, G., Das, B. K., Mishal, P., Tayung, T., Kumari, S., Sarkar, U. K., Das, A. K., & Ali, Y. (2021). Impact of stocking density on growth, feed utilization and survival of cage reared minor carp, *Labeo bata* (Hamilton, 1822) in Maithon reservoir, India. *Aquaculture*, 532. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736078>
- Khansari, A. R., Balasch, J. C., Reyes-lópez, F. E., & Tort, L. (2017a). Stressing the Inflammatory Network : Immuno-endocrine Responses to Allostatic Load in Fish. *Journal of Marine Science Research and Technology*, July, 1–14.
- Khansari, A. R., Balasch, J. C., Reyes-lópez, F. E., & Tort, L. (2017b). Stressing the Inflammatory Network : Immuno-endocrine Responses to Allostatic Load in Fish. *Journal of Marine Science Research and Technology*, July, 1–14.
- Kitazawa, T., & Kaiya, H. (2019). Regulation of gastrointestinal motility by motilin and ghrelin in vertebrates. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 10, Issue MAY). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00278>
- Kojima, M., & Kangawa, K. (2005). *Ghrelin: Structure and Function*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2004.-Small>
- Koolhaas, J. M., Bartolomucci, A., Buwalda, B., de Boer, S. F., Flügge, G., Korte, S. M., Meerlo, P., Murison, R., Olivier, B., Palanza, P., Richter-Levin, G., Sgoifo, A., Steimer, T., Stiedl, O., van Dijk, G., Wöhr, M., & Fuchs, E. (2011). Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 35(5), 1291–1301. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.02.003>
- Kubota, N., Amemiya, S., Motoki, C., Otsuka, T., Nishijima, T., & Kita, I. (2012). Corticotropin-releasing factor antagonist reduces activation of noradrenalin and serotonin neurons in the locus coeruleus and dorsal raphe in the arousal response accompanied by yawning behavior in rats. *Neuroscience Research*, 72(4), 316–323. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2012.01.001>
- Kumar, D., Eipper, B. A., & Mains, R. E. (2014). Amidation☆. In *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801238-3.04040-x>
- Kurokawa, T., & Murashita, K. (2009). Genomic characterization of multiple leptin genes and a leptin receptor gene in the Japanese medaka, *Oryzias latipes*. *General and Comparative Endocrinology*, 161(2), 229–237. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.01.008>
- Laigneau, J., & Moizo, L. (1998). *The stomach is a source of leptin*. 394(August), 790–793.
- Larhammar, D. (1996). Evolution of neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide. *Regulatory Peptides*, 62(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/0167-0115\(95\)00169-7](https://doi.org/10.1016/0167-0115(95)00169-7)
- Lau, J., & Herzog, H. (2014). CART in the regulation of appetite and energy homeostasis. *Frontiers in Neuroscience*, 8(SEP). <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00313>
- letters to nature*. (2001). www.nature.com
- Li, D., Liu, Z., & Xie, C. (2012). Effect of stocking density on growth and serum concentrations of thyroid hormones and cortisol in Amur sturgeon, *Acipenser schrenckii*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(2), 511–520. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9531-y>
- Liang, X., Yu, X., Han, J., Yu, H., Chen, P., Wu, X., Zheng, Y., & Xue, M. (2019). Effects of dietary protein sources on growth performance and feed intake regulation of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Aquaculture*, 510, 216–224. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.05.059>
- Lie, K. K., Tørresen, O. K., Solbakken, M. H., Rønnestad, I., Tooming-Klunderud, A., Nederbragt, A. J., Jentoft, S., & Sæle, Ø. (2018). Loss of stomach, loss of appetite? Sequencing of the ballan wrasse (*Labrus bergylta*) genome and intestinal transcriptomic profiling illuminate the

- evolution of loss of stomach function in fish. *BMC Genomics*, 19(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4570-8>
- Lin, X., Ne Volkoff, H., Narnaware, Y., Bernier, N. J., Peyon, P., & Peter, R. E. (2000). Brain regulation of feeding behavior and food intake in fish. In *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* (Vol. 126). www.elsevier.com/locate/cbpa
- Lin, X., Volkoff, H., Narnaware, Y., J. B. N., Peyon, P., & Peter, R. E. (2000). Brain regulation of feeding behavior and food intake in fish [Video recording]. In *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* (Vol. 126, pp. 415–434).
- Liongue, C., & Ward, A. C. (2007). Evolution of Class I cytokine receptors. *BMC Evolutionary Biology*, 7. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-120>
- Liu, F., Lv, X., Chu, T., Wang, M., Zhan, W., & Lou, B. (2021). Characterization of ghrelin mRNA expression in fasting *Larimichthys crocea* juveniles. *Acta Oceanologica Sinica*, 40(6), 35–40. <https://doi.org/10.1007/s13131-020-1692-z>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lorenzen, K., & Enberg, K. (2002). Density-dependent growth as a key mechanism in the regulation of fish populations: Evidence from among-population comparisons. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 269(1486), 49–54. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1853>
- Lotta Leveelahti. (2016). HYPOXIA INDUCIBLE FACTOR 1 α IN AQUATIC VERTEBRATES. *Clinical Calcium*, 26(10), 1429–1435.
- Lulhier F, L. J. G. B. S. N. S. M. G. de S. (1999). Plasmatic levels of cortisol in the response to acute stress in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), previously exposed to chronic stress [Video recording]. In *Aquaculture Research* (Vol. 30, Issue 6, pp. 437–444). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1999.00348.x>
- Luna, M., Llorente, I., & Cobo, Á. (n.d.). *Determination of feeding strategies in aquaculture farms using a multiple-criteria approach and genetic algorithms*.
- Lv, H. B., Ma, Y. ying, Hu, C. T., Lin, Q. Y., Yue, J. jia yu, Chen, L. Q., Zhang, M. L., Du, Z. Y., & Qiao, F. (2021). The individual and combined effects of hypoxia and high-fat diet feeding on nutrient composition and flesh quality in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Food Chemistry*, 343. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128479>
- Mankiewicz, J. L., Deck, C. A., Taylor, J. D., Douros, J. D., & Borski, R. J. (2021). Epinephrine and glucose regulation of leptin synthesis and secretion in a teleost fish, the tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *General and Comparative Endocrinology*, 302. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113669>
- Martins, C. I. M., Galhardo, L., Noble, C., Damsgård, B., Spedicato, M. T., Zupa, W., Beauchaud, M., Kulczykowska, E., Massabuau, J. C., Carter, T., Planellas, S. R., & Kristiansen, T. (2012). Behavioural indicators of welfare in farmed fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(1), 17–41. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9518-8>
- Martins, R. S. T., Sousa, C., Andrade, A. R., Molés, G., Zanuy, S., Gómez, A., Canário, A. V. M., & Pinto, P. I. S. (2021). Galanin isoforms by alternative splicing: Structure, expression, and immunohistochemical location in the gonads of European sea bass. *General and Comparative Endocrinology*, 305. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2021.113730>
- Matsuda, K. (2013). Regulation of feeding behavior and psychomotor activity by corticotropin-releasing hormone (CRH) in fish. *Frontiers in Neuroscience*, 7 MAY. <https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00091>

- Matsuda, K., Kang, K. S., Sakashita, A., Yahashi, S., & Vaudry, H. (2011). Behavioral effect of neuropeptides related to feeding regulation in fish. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1220(1), 117–126. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05884.x>
- Matsuda, K., Miura, T., Kaiya, H., Maruyama, K., Shimakura, S. I., Uchiyama, M., Kangawa, K., & Shioda, S. (2006). Regulation of food intake by acyl and des-acyl ghrelin in the goldfish. *Peptides*, 27(9), 2321–2325. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.03.028>
- Mazur, C. F., & Iwama, G. K. (1993). Handling and crowding stress reduces number of plaque-forming cells in atlantic salmon. *Journal of Aquatic Animal Health*, 5(2), 98–101. [https://doi.org/10.1577/1548-8667\(1993\)005<0098:HACSRN>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(1993)005<0098:HACSRN>2.3.CO;2)
- Mcclelland, G., Zwingelstein, G., Weber, J.-M., & Brichon, G. (n.d.). *Lipid composition of tissue and plasma in two mediterranean fishes, the gilt-head sea bream (Chrysophrys auratus) and the European seabass (Dicentrarchus labrax)*. www.nrcresearchpress.com
- Metz, J. R., Ampe, B., Decostere, A., Aerts, J., De Saeger, S., & Flik, G. (2015). Scales Tell a Story on the Stress History of Fish. *Plos One*, 10(4), e0123411. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123411>
- Michel, M., Page-McCaw, P. S., Chen, W., & Cone, R. D. (2016). Leptin signaling regulates glucose homeostasis, but not adipostasis, in the zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(11), 3084–3089. <https://doi.org/10.1073/pnas.1513212113>
- Mills, E. G., Izzi-Engbeaya, C., Abbara, A., Comninou, A. N., & Dhillo, W. S. (2021). Functions of galanin, spexin and kisspeptin in metabolism, mood and behaviour. In *Nature Reviews Endocrinology* (Vol. 17, Issue 2, pp. 97–113). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41574-020-00438-1>
- Minokoshi, Y., & Kahn, B. B. (2003). Role of AMP-activated protein kinase in leptin-induced fatty acid oxidation in muscle. *Biochemical Society Transactions*, 31(1), 196–201. <https://doi.org/10.1042/bst0310196>
- Mohd Zahir, I., Ogawa, S., Dominic, N. A., Soga, T., & Parhar, I. S. (2022). Spexin and Galanin in Metabolic Functions and Social Behaviors With a Focus on Non-Mammalian Vertebrates. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.882772>
- Montera, D., Izquierda, M. S., Tort, L., Robaina, L., & Vergara, J. M. (1999). High stocking density produce crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, Sparus aurata, juveniles [Video recording]. In *Fish Physiology and Biochemistry* (Vol. 20, pp. 53–60). <https://doi.org/10.1023/A>
- Möstl, E., & Palme, R. (2002). Hormones as indicators of stress. In *Domestic Animal Endocrinology* (Vol. 23).
- Murashita, K., Kurokawa, T., Nilsen, T. O., & Rønnestad, I. (2009). Ghrelin, cholecystokinin, and peptide YY in Atlantic salmon (*Salmo salar*): Molecular cloning and tissue expression. *General and Comparative Endocrinology*, 160(3), 223–235. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.11.024>
- Nakamachi, T., Shibata, H., Sakashita, A., Iinuma, N., Wada, K., Konno, N., & Matsuda, K. (2014). Orexin A enhances locomotor activity and induces anxiogenic-like action in the goldfish, *Carassius auratus*. *Hormones and Behavior*, 66(2), 317–323. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.06.004>
- Narnaware, Y. K., Peyon, P. P., Lin, X., & Peter, R. E. (2000). Regulation of food intake by neuropeptide Y in goldfish. In *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* (Vol. 279). <http://www.ajpregu.org->

- Nilsson, G. E. & Ostlund-Nilsson, S. Hypoxia in paradise: widespread hypoxia tolerance in coral reef fishes. *Proc Royal Soc London B-Biol Sci.* 271, S30–S33 (2004).
- Nielsen, J. L., & Pavey, S. A. (2010). 2010. Perspectives: Gene expression in fisheries management. In *Current Zoology* (Vol. 56, Issue 1).
- Nisembaum, L. G., de Pedro, N., Delgado, M. J., & Isorna, E. (2014). Crosstalk between the “gut-brain” hormone ghrelin and the circadian system in the goldfish. Effects on clock gene expression and food anticipatory activity. *General and Comparative Endocrinology*, 205, 287–295. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.03.016>
- Nishi, Y., Yoh, J., Hiejima, H., & Kojima, M. (2011a). Structures and molecular forms of the ghrelin-family peptides. In *Peptides* (Vol. 32, Issue 11, pp. 2175–2182). <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.07.024>
- Nishi, Y., Yoh, J., Hiejima, H., & Kojima, M. (2011b). Structures and molecular forms of the ghrelin-family peptides. In *Peptides* (Vol. 32, Issue 11, pp. 2175–2182). <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.07.024>
- Nunez-Salces, M., Li, H., Feinle-Bisset, C., Young, R. L., & Page, A. J. (2020). Nutrient-sensing components of the mouse stomach and the gastric ghrelin cell. *Neurogastroenterology and Motility*, 32(12), 1–13. <https://doi.org/10.1111/nmo.13944>
- Øverli, Ø., Sørensen, C., Pulman, K. G. T., Pottinger, T. G., Korzan, W., Summers, C. H., & Nilsson, G. E. (2007). Evolutionary background for stress-coping styles: Relationships between physiological, behavioral, and cognitive traits in non-mammalian vertebrates. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 31, Issue 3, pp. 396–412). <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2006.10.006>
- Pankhurst, N. W., King, H. R., & Ludke, S. L. (2008). Relationship between stress, feeding and plasma ghrelin levels in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 41(1), 53–64. <https://doi.org/10.1080/10236240701661156>
- Parhar, I. S., Sato, H., & Sakuma, Y. (2003). Ghrelin gene in cichlid fish is modulated by sex and development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 305(1), 169–175. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00729-0](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00729-0)
- Park, H. K., & Ahima, R. S. (2014). Leptin signaling. *F1000Prime Reports*, 6(September). <https://doi.org/10.12703/P6-73>
- Parker, C. G., & Cheung, E. (2020). Metabolic control of teleost reproduction by leptin and its complements: Understanding current insights from mammals. In *General and Comparative Endocrinology* (Vol. 292). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113467>
- Pawlak, P., Burren, A., Seitz, A., & Pietsch, C. (2023). Effects of different acute stressors on the regulation of appetite genes in the carp (*Cyprinus carpio* L.) brain. *Royal Society Open Science*, 10(2). <https://doi.org/10.1098/rsos.230040>
- Perelló-Amorós, M., Vélez, E. J., Vela-Albesa, J., Sánchez-Moya, A., Riera-Heredia, N., Hedén, I., Fernández-Borràs, J., Blasco, J., Caldach-Giner, J. A., Navarro, I., Capilla, E., Jönsson, E., Pérez-Sánchez, J., & Gutiérrez, J. (2019). Ghrelin and its receptors in gilthead sea bream: Nutritional regulation. *Frontiers in Endocrinology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00399>
- Pickering, A. D. (1993). Growth and stress in fish production. In *Aquaculture* (Vol. 111, Issues 1–4). Elsevier Science B.V. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(93\)90024-S](https://doi.org/10.1016/0044-8486(93)90024-S)
- Pijanowski, L., Jurecka, P., Irnazarow, I., Kepka, M., Szwejsler, E., Verburg-Van Kemenade, B. M. L., & Chadzinska, M. (2015). Activity of the hypothalamus–pituitary–interrenal axis (HPI axis) and immune response in carp lines with different susceptibility to disease. *Fish Physiology and Biochemistry*, 41(5), 1261–1278. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0084-3>

- Poher, A. L., Tschöp, M. H., & Müller, T. D. (2018). Ghrelin regulation of glucose metabolism. *Peptides*, *100*(December 2017), 236–242. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.12.015>
- Pollock, M. S., Clarke, L. M. J., & Dubé, M. G. (2007). The effects of hypoxia on fishes: From ecological relevance to physiological effects. *Environmental Reviews*, *15*, 1–14. <https://doi.org/10.1139/a06-006>
- Prokop, J. W., Duff, R. J., Ball, H. C., Copeland, D. L., & Londrville, R. L. (2012a). Leptin and leptin receptor: Analysis of a structure to function relationship in interaction and evolution from humans to fish. *Peptides*, *38*(2), 326–336. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.10.002>
- Prokop, J. W., Duff, R. J., Ball, H. C., Copeland, D. L., & Londrville, R. L. (2012b). Leptin and leptin receptor: Analysis of a structure to function relationship in interaction and evolution from humans to fish. *Peptides*, *38*(2), 326–336. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.10.002>
- Reid, S. G., Bernier, N. J., & Perry, S. F. (1998). The adrenergic stress response in fish: Control of catecholamine storage and release. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology*, *120*(1), 1–27. [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(98\)00037-1](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(98)00037-1)
- Rønnestad, I., Gomes, A. S., Murashita, K., Angotzi, R., Jönsson, E., & Volkoff, H. (2017a). Appetite-controlling endocrine systems in teleosts. *Frontiers in Endocrinology*, *8*(APR), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00073>
- Rønnestad, I., Gomes, A. S., Murashita, K., Angotzi, R., Jönsson, E., & Volkoff, H. (2017b). Appetite-controlling endocrine systems in teleosts. *Frontiers in Endocrinology*, *8*(APR). <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00073>
- Rønnestad, I., Gomes, A. S., Murashita, K., Angotzi, R., Jönsson, E., & Volkoff, H. (2017c). Appetite-controlling endocrine systems in teleosts. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 8, Issue APR). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00073>
- Rønnestad, I., Nilsen, T. O., Murashita, K., Angotzi, A. R., Gamst Moen, A. G., Stefansson, S. O., Kling, P., Thrandur Björnsson, B., & Kurokawa, T. (2010a). Leptin and leptin receptor genes in Atlantic salmon: Cloning, phylogeny, tissue distribution and expression correlated to long-term feeding status. *General and Comparative Endocrinology*, *168*(1), 55–70. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.04.010>
- Rønnestad, I., Nilsen, T. O., Murashita, K., Angotzi, A. R., Gamst Moen, A. G., Stefansson, S. O., Kling, P., Thrandur Björnsson, B., & Kurokawa, T. (2010b). Leptin and leptin receptor genes in Atlantic salmon: Cloning, phylogeny, tissue distribution and expression correlated to long-term feeding status. *General and Comparative Endocrinology*, *168*(1), 55–70. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.04.010>
- Ronquist, F., & Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, *19*(12), 1572–1574. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>
- Rotllant, J. (1997). Cortisol and glucose responses after acute stress by net handling in the sparid red porgy previously subjected to crowding stress. *Journal of Fish Biology*, *51*(1), 21–28. <https://doi.org/10.1006/jfbi.1997.0405>
- Rousseau, K., Dufour, S., & Sachs, L. M. (2021). Interdependence of Thyroid and Corticosteroid Signaling in Vertebrate Developmental Transitions. In *Frontiers in Ecology and Evolution* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.735487>
- Saitou, N. (1988). Property and Efficiency of the Maximum Likelihood Method for Molecular Phylogeny. In *J Mol Evol* (Vol. 27).

- Sakata, I., & Sakai, T. (2010). Ghrelin cells in the gastrointestinal tract. *International Journal of Peptides*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/945056>
- Salmerón, C., Johansson, M., Angotzi, A. R., Rønnestad, I., Jönsson, E., Björnsson, B. T., Gutiérrez, J., Navarro, I., & Capilla, E. (2015). Effects of nutritional status on plasma leptin levels and in vitro regulation of adipocyte leptin expression and secretion in rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology*, 210, 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.10.016>
- Schram, E., Van Der Heul, J. W., Kamstra, A., & Verdegem, M. C. J. (2006). Stocking density-dependent growth of Dover sole (*Solea solea*). *Aquaculture*, 252(2–4), 339–347. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.07.011>
- Schreck, C. B., & Tort, L. (2016). The Concept of Stress in Fish. In *Fish Physiology* (First Edit, Vol. 35). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802728-8.00001-1>
- Schulte, P. M. (2014). What is environmental stress? Insights from fish living in a variable environment. *Journal of Experimental Biology*, 217(1), 23–34. <https://doi.org/10.1242/jeb.089722>
- Schwartz, G. J., Azzara, A. V., & Heaner, M. K. (2013). Roles for central leptin receptors in the control of meal size. *Appetite*, 71, 466–469. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2013.04.017>
- Shaikh, S. R., Shaver, P. R., & Shewchuk, B. M. (2018). High Fat Diet Dysregulates Hypothalamic-Pituitary Axis Gene Expression Levels which are Differentially Rescued by EPA and DHA Ethyl Esters. *Molecular Nutrition and Food Research*, 62(13), 1–28. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201800219>
- Sharma, P., Banerjee, J. J., Mahapatra, S., Shanmugam, S. A., & Prakash, S. (2024). Unlocking potential: Gene expression and regulation in aquaculture. In *Chron Aquat Sci* (Vol. 1, Issue 11).
- Shewale, S. A., Deshbhratar, S. M., Ravikumar, A., & Bhargava, S. Y. (2021). Cocaine and amphetamine regulated transcript peptide (CART) in the tadpole brain: Response to different energy states. *Neuropeptides*, 88. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2021.102152>
- Singh, A., de Araujo, A. M., Krieger, J. P., Vergara, M., Ip, C. K., & de Lartigue, G. (2021). Demystifying functional role of cocaine- and amphetamine-related transcript (CART) peptide in control of energy homeostasis: A twenty-five year expedition. *Peptides*, 140. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2021.170534>
- Small, B. C., Quiniou, S. M. A., Kaiya, H., Bledsoe, J. W., & Musungu, B. (2019). Characterization of a third ghrelin receptor, GHS-R3a, in channel catfish reveals novel expression patterns and a high affinity for homologous ligand. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 229, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.11.013>
- Sopinka, N. M., Donaldson, M. R., O'Connor, C. M., Suski, C. D., & Cooke, S. J. (2016). Stress Indicators in Fish. In *Fish Physiology* (Vol. 35, pp. 405–462). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802728-8.00011-4>
- Soya, S., & Sakurai, T. (2020). Evolution of Orexin Neuropeptide System: Structure and Function. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00691>
- Stehfest, K. M., Carter, C. G., McAllister, J. D., Ross, J. D., & Semmens, J. M. (2017). Response of Atlantic salmon *Salmo salar* to temperature and dissolved oxygen extremes established using animal-borne environmental sensors. *Scientific Reports*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04806-2>
- Sun, P., Bao, P., & Tang, B. (2017). Transcriptome analysis and discovery of genes involved in immune pathways in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) under high stocking density stress. *Fish and Shellfish Immunology*, 68, 332–340. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.07.013>

- Sweeney, G. (2002). *Leptin signalling 3* (Vol. 14, pp. 655–663) [Video recording].
- Tachibana, T., Takagi, T., Tomonaga, S., Ohgushi, A., Ando, R., Denbow, D. M., & Furuse, M. (n.d.). *Central administration of cocaine-and amphetamine-regulated transcript inhibits food intake in chicks*. <https://doi.org/10.1016/S03>
- Tinoco, A. B., Nisembaum, L. G., de Pedro, N., Delgado, M. J., & Isorna, E. (2014). Leptin expression is rhythmic in brain and liver of goldfish (*Carassius auratus*). Role of feeding time. *General and Comparative Endocrinology*, *204*, 239–247. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.06.006>
- Toshinai, K., Yamaguchi, H., Sun, Y., Smith, R. G., Yamanaka, A., Sakurai, T., Date, Y., Mondal, M. S., Shimbara, T., Kawagoe, T., Murakami, N., Miyazato, M., Kangawa, K., & Nakazato, M. (2006). Des-acyl ghrelin induces food intake by a mechanism independent of the growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology*, *147*(5), 2306–2314. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1357>
- Trombley, S., Maugars, G., Kling, P., Björnsson, B. T., & Schmitz, M. (2012a). Effects of long-term restricted feeding on plasma leptin, hepatic leptin expression and leptin receptor expression in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *General and Comparative Endocrinology*, *175*(1), 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.10.001>
- Trombley, S., Maugars, G., Kling, P., Björnsson, B. T., & Schmitz, M. (2012b). Effects of long-term restricted feeding on plasma leptin, hepatic leptin expression and leptin receptor expression in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *General and Comparative Endocrinology*, *175*(1), 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.10.001>
- Unniappan, S., & Peter, R. E. (2005a). Structure, distribution and physiological functions of ghrelin in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, *140*(4), 396–408. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.02.011>
- Unniappan, S., & Peter, R. E. (2005b). Structure, distribution and physiological functions of ghrelin in fish. In *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* (Vol. 140, Issue 4, pp. 396–408). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.02.011>
- Vega, B., Toro-Araneda, T., Alvarado, J. F., Cárcamo, C. B., Guzmán, F., Acosta, F., Oliva, M., Serrano, E., Galarza, J. I., & Álvarez, C. A. (2024). Effects of Hypoxia on the Antibacterial Activity of Epidermal Mucus from Chilean Meagre (*Cilus gilberti*). *Animals*, *14*(13), 2014. <https://doi.org/10.3390/ani14132014>
- Velasco, C., Librán-Pérez, M., Otero-Rodiño, C., López-Patiño, M. A., Míguez, J. M., Cerdá-Reverter, J. M., & Soengas, J. L. (2016). Ghrelin modulates hypothalamic fatty acid-sensing and control of food intake in rainbow trout. *Journal of Endocrinology*, *228*(1), 25–37. <https://doi.org/10.1530/JOE-15-0391>
- Vélez, E. J., Lutfi, E., Azizi, S., Perelló, M., Salmerón, C., Riera-Codina, M., Ibarz, A., Fernández-Borràs, J., Blasco, J., Capilla, E., Navarro, I., & Gutiérrez, J. (2017). Understanding fish muscle growth regulation to optimize aquaculture production. *Aquaculture*, *467*, 28–40. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.07.004>
- Vijayan, M. M., Ballantyne, J. S., & Leatherland, J. F. (1990). High stocking density alters the energy metabolism of brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *Aquaculture*, *88*(3–4), 371–381. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(90\)90162-G](https://doi.org/10.1016/0044-8486(90)90162-G)
- Vijayan, M. M., & Leatherland, J. F. (1990). High stocking density affects cortisol secretion and tissue distribution in brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *Journal of Endocrinology*, *124*(2), 311–318. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1240311>
- Vissers, M., Gorissen, M., Flik, G., & Huising, M. O. (n.d.). *Leptin in Teleost Fish*. <http://hdl.handle.net/2066/87157>

- Volkoff, H. (2016a). The neuroendocrine regulation of food intake in fish: A review of current knowledge. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 10, Issue NOV). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00540>
- Volkoff, H. (2016b). The neuroendocrine regulation of food intake in fish: A review of current knowledge. *Frontiers in Neuroscience*, *10*(NOV), 1–31. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00540>
- Volkoff, H., Canosa, L. F., Unniappan, S., Cerdá-Reverter, J. M., Bernier, N. J., Kelly, S. P., & Peter, R. E. (2005). Neuropeptides and the control of food intake in fish. *General and Comparative Endocrinology*, *142*(1-2 SPEC. ISS.), 3–19. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2004.11.001>
- Wada, N., Hirako, S., Takenoya, F., Kageyama, H., Okabe, M., & Shioda, S. (2014). Leptin and its receptors. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, *61*, 191–199. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2014.09.002>
- Wen, Z. Y., Qin, C. J., Wang, J., He, Y., Li, H. T., Li, R., & Wang, X. D. (2020). Molecular characterization of two leptin genes and their transcriptional changes in response to fasting and refeeding in Northern snakehead (*Channa argus*). *Gene*, *736*. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144420>
- Wendelaar Bonga, S. E. (1997). The stress response in fish. *Physiological Reviews*, *77*(3), 591–625. <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.3.591>
- Won, E. T., Baltzegar, D. A., Picha, M. E., & Borski, R. J. (2012a). Cloning and characterization of leptin in a Perciform fish, the striped bass (*Morone saxatilis*): Control of feeding and regulation by nutritional state. *General and Comparative Endocrinology*, *178*(1), 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.04.019>
- Won, E. T., Baltzegar, D. A., Picha, M. E., & Borski, R. J. (2012b). Cloning and characterization of leptin in a Perciform fish, the striped bass (*Morone saxatilis*): Control of feeding and regulation by nutritional state. *General and Comparative Endocrinology*, *178*(1), 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.04.019>
- Won, E. T., Douros, J. D., Hurt, D. A., & Borski, R. J. (2016). Leptin stimulates hepatic growth hormone receptor and insulin-like growth factor gene expression in a teleost fish, the hybrid striped bass. *General and Comparative Endocrinology*, *229*, 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.02.003>
- Xia, L. B., Liu, H. Y., Wang, B. Y., Lin, H. N., Wang, M. C., & Ren, J. X. (2023). A review of physiological functions of orexin: From instinctive responses to subjective cognition. In *Medicine (United States)* (Vol. 102, Issue 26, p. E34206). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000034206>
- Yan, A. F., Chen, T., Chen, S., Ren, C. H., Hu, C. Q., Cai, Y. M., Liu, F., & Tang, D. S. (2016). Goldfish leptin-AI and leptin-AII: Function and central mechanism in feeding control. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(6). <https://doi.org/10.3390/ijms17060783>
- Yan, A. F., Chen, T., Chen, S., Tang, D. S., Liu, F., Jiang, X., Huang, W., Ren, C. H., & Hu, C. Q. (2016). Signal transduction mechanism for glucagon-induced leptin gene expression in goldfish liver. *International Journal of Biological Sciences*, *12*(12), 1544–1554. <https://doi.org/10.7150/ijbs.16612>
- Yang, L., Zhi, S., Hu, J., Zhang, W., Zhang, Y., Qin, C., Yang, G., Yan, X., & Nie, G. (2020). Common carp (*Cyprinus carpio*) orexin: Molecular identification, tissue expression, and the role of Orexin-A in glucose metabolism. *Aquaculture Reports*, *18*. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100528>
- Yarahmadi, P., Miandare, H. K., Fayaz, S., & Caipang, C. M. A. (2016). Increased stocking density causes changes in expression of selected stress- and immune-related genes, humoral innate

- immune parameters and stress responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology*, 48, 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.11.007>
- Yuan, D., Wang, B., Tang, T., Lei, L., Zhou, C., Li, Z., & Li, L. (2021). Characterization and evaluation of the tissue distribution of CRH, apelin, and GnRH2 reveal responses to feeding states in *Schizothorax davidi*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 47(2), 421–438. <https://doi.org/10.1007/s10695-020-00922-5>
- Zabeau, L., Defeau, D., Iserentant, H., Vandekerckhove, J., Peelman, F., & Tavernier, J. (2005). Leptin receptor activation depends on critical cysteine residues in its fibronectin type III subdomains. *Journal of Biological Chemistry*, 280(24), 22632–22640. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413308200>
- Zhang, Y., & Chua, S. (2018). Leptin function and regulation. *Comprehensive Physiology*, 8(1), 351–369. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160041>
- Zhang, Z., Fu, Y., Zhao, H., & Zhang, X. (2022). Social enrichment affects fish growth and aggression depending on fish species: Applications for aquaculture. *Frontiers in Marine Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.1011780>
- Zhao, H., Zeng, C., Yi, S., Wan, S., Chen, B., & Gao, Z. (2015). Leptin genes in blunt snout bream: Cloning, phylogeny and expression correlated to gonads development. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), 27609–27624. <https://doi.org/10.3390/ijms161126044>
- Zhong, H., Hu, Y., & Yu, F. (2021). A review on ghrelin and fish reproduction. In *Reproduction and Breeding* (Vol. 1, Issue 2, pp. 128–135). KeAi Communications Co. <https://doi.org/10.1016/j.repbre.2021.07.004>
- Zhou, C., Zheng, J., Lei, L., Yuan, D., Zhu, C., Ye, H., Zhang, C., Wang, D., Yang, M., Wu, J., Zhu, L., & Zeng, B. (2016a). Evidence that ghrelin may be associated with the food intake of gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 42(6), 1637–1646. <https://doi.org/10.1007/s10695-016-0246-y>
- Zhou, C., Zheng, J., Lei, L., Yuan, D., Zhu, C., Ye, H., Zhang, C., Wang, D., Yang, M., Wu, J., Zhu, L., & Zeng, B. (2016b). Evidence that ghrelin may be associated with the food intake of gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 42(6), 1637–1646. <https://doi.org/10.1007/s10695-016-0246-y>



Contents lists available at ScienceDirect

Aquaculture Reports

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aqrep

Characterization and gene expression profiles of *Cilus gilberti* leptin in response to culture parameters

Juan F. Alvarado^{a,1}, Belinda Vega^{b,1}, Claudia B. Cárcamo^{b,c}, Marcia Oliva^d, Elisa Torres^e, Fanny Guzmán^f, Paula Santana^g, Felix Acosta^h, Luis Mercadoⁱ, Claudio A. Álvarez^{d,*}

^a Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de El Salvador, San Salvador, El Salvador

^b Laboratorio de Fisiología y Genética Marina (FIGEMA), Centro de Estudios Avanzados en Zonas Áridas (CEAZA), Coquimbo, Chile

^c Marine Department, Tilad Group, Riad, Saudi Arabia

^d Laboratorio de Cultivo de Peces, Departamento de Acuicultura, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Católica del Norte, Coquimbo, Chile

^e Doctorado en Biología y Ecología Aplicada, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Católica del Norte, Coquimbo, Chile

^f Núcleo Biotecnología Curauama, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile

^g Instituto de Ciencias Aplicadas, Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Chile, El Llano Subercaseaux 2801, San Miguel, Santiago, Chile

^h Grupo de Investigación en Acuicultura (GIA), Instituto Universitario Ecoagua, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Islas Canarias, Spain

ⁱ Instituto de Biología, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso 2373223, Chile

ARTICLE INFO

Keywords:

Leptin
Chilean meagre
Hypoxia
Stock density
Biomarker

ABSTRACT

The Chilean meagre, *Cilus gilberti*, emerges as a novel species to South American aquaculture. Nevertheless, the successful establishment of its cultivation necessitates careful consideration of productive parameters and tolerance to abiotic stressors. To address these challenges, the identifications of biomarkers emerges as a promising approach. Indeed, leptin stands out as a potential biomarker, given its multifaceted role. This study focuses on characterizing leptin in *C. gilberti* (cgLep) and assessing its gene expression in juveniles exposed to different culture and feeding conditions. The results indicated that cgLep coding sequence yields a 137-amino acid prohormone, preserving high relevant cysteine residues for maintaining its structural integrity. Basal cgLep gene expression profiles reveal its expression mainly in the liver, followed by white muscle. Conversely, its receptor (cgLepR) exhibits higher levels in white muscle. Additionally, it was observed that juveniles in a postprandial state exhibited an upregulation of hepatic cgLep. Simultaneously, the cgLepR showed a significant increase at brain level during the preprandial stage. The exposure to acute hypoxia revealed a notable upregulation of cgLep after two hours of low oxygen availability and returned to normoxia baseline after six hours post-hypoxia. Notably, when subjected to a prolonged daily hypoxia regimen, no significant differences in leptin mRNA expression were observed. This suggests a dynamic adaptive response of the *C. gilberti* leptin system to hypoxia. Finally, juvenile Chilean meagre cultivated at 15 Kg/m³ showcase significant individual variability in hepatic leptin expression levels when compared to those cultured at 25 or 35 kg/m³. These observations highlight that leptin primarily expresses in the liver and its expression is notably influenced by fasting periods and chronic stress induced by low stock density. This variability in leptin expression could potentially impact food intake, emphasizing the importance of considering these factors in the design and implementation of aquaculture practices for Chilean meagre.

1. Introduction

Leptin, a pleiotropic hormone found in both mammals and fish, plays a pivotal role in regulating broad spectra of physiological processes, including appetite, lipid metabolism, growth, reproduction, stress, and

immune response. Despite its role in vertebrates, the functional properties of leptin exhibit intriguing divergences among teleosts, suggesting a species-specific adaptation that may be intricately linked to variations in feeding behaviors and environmental habitats (Friedman, 2015; Deck et al., 2017).

* Corresponding author.

E-mail address: claudio.alvarez@ucn.cl (C.A. Álvarez).

¹ These authors have contributed equally to this work

<https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2024.102273>

Received 10 May 2024; Received in revised form 8 July 2024; Accepted 24 July 2024

Available online 1 August 2024

2352-5134/© 2024 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).



Contents lists available at ScienceDirect

Aquaculture

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aquaculture

First insights about orexigenic activity and gastrointestinal tissue localization of ghrelin from Corvina drum (*Cilus gilberti*)

Claudio A. Álvarez^{a,b,*}, Juan F. Alvarado^{c,a}, Matías Farías^d, Claudia B. Cárcamo^{e,a}, Héctor Flores^b, Fanny Guzmán^f, Sebastián San Martín^g, Juan Varas^g, Sebastián Messina^b, Félix Acosta^h, Nieves Sandovalⁱ, Belinda Vega^a, Paula A. Santana^{j,**}

^a Laboratorio de Fisiología y Genética Marina (FIGEMA), Centro de Estudios Avanzados en Zonas Áridas (CEAZA), Coquimbo, Chile

^b Departamento de Acuicultura, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Católica del Norte, Coquimbo, Chile

^c Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de El Salvador, San Salvador, El Salvador

^d Escuela de Biología Marina, Facultad de Ciencias del Mar y de Recursos Naturales, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile

^e Centro de Innovación Acuicola (AquaPacífico), Universidad Católica del Norte, Chile

^f Núcleo Biotecnología Curauma (NBC), Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile

^g Centro de Investigaciones Biomédicas (CIB), Escuela de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile

^h Grupo de Investigación en Acuicultura (GIA), Instituto Universitario Eoaqua, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Islas Canarias, Spain

ⁱ National University of San Marcos, School of Veterinary Medicine, Department of Ictiopathology, Av. Circunvalación 2800, San Borja, Lima, Peru

^j Instituto de Ciencias Químicas Aplicadas, Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Chile, El Llano Subercaseaux 2801, San Miguel, Santiago, Chile

ARTICLE INFO

Keywords:

Ghrelin
C. gilberti
 Orexigenic
 GHS-R receptor
 Gastrointestinal tissue

ABSTRACT

The croaker *Cilus gilberti* commonly known as Corvina drum is considered a target marine species for the diversification of Chilean aquaculture. To optimize culture conditions, molecular markers for appetite regulation must be examined. Ghrelin, a gastrointestinal peptide, plays a stimulatory role in the food intake of mammals and teleost fish. Nevertheless, even though the appetite-controlling system is considered relatively well conserved among vertebrates, the bioactivity of these molecules should be analyzed in each fish species. Therefore, this study aimed to investigate the expression and orexigenic ability of *C. gilberti* ghrelin. After the pre and postprandial period, the stomach expression of ghrelin mRNA in juvenile *C. gilberti* was analyzed. The coding sequence of *C. gilberti* ghrelin was used to identify the mature peptide and then chemically synthesized. The orexigenic ability of acylated ghrelin (cgGhre) and non-acylated (D-cgGhre) ghrelin was tested in *C. gilberti* juveniles. Moreover, the blood and the gastrointestinal location of synthetic ghrelin after intraperitoneal injection were measured. The results showed that the stomach has the highest expression of ghrelin mRNA, and that ghrelin levels increased in the preprandial period and diminished after it. There were no differences in the secondary structure of D-cgGhre compared to cgGhre but the peptide with the serine acylation stabilized its unordered conformation. However, the highest cumulative feed intake occurred in fish intraperitoneally injected with cgGhre. In addition, synthetic ghrelin was maintained in the *C. gilberti* blood until 8 h post-injection (hpi). Finally, biotinylated ghrelin allowed localizing the synthetic peptide in digestive tissue, mainly in the stomach and pyloric caeca. The mRNA expression of the growth hormone secretagogue receptor (GHS-R), also known as the ghrelin receptor, in gastrointestinal organs supports the idea of peripheral orexigenic regulation in these tissues. In conclusion, results suggest that *C. gilberti* ghrelin conserves the orexigenic ability reported in other teleost fish with a regulatory role in the gastrointestinal tract (GIT) of the Corvina drum. This is the first report demonstrating the uptake and distribution of a small orexigenic peptide in the digestive tissues of a South American sciaenid. Although ghrelin is a promising molecular marker for feed intake analysis in *C. gilberti* culture, further research is needed to continue evaluating the effects of aquaculture practices on peripheral appetite signalizer.

* Corresponding author at: Laboratorio de Fisiología y Genética Marina (FIGEMA), Centro de Estudios Avanzados en Zonas Áridas (CEAZA), Coquimbo, Chile.

** Corresponding author.

E-mail addresses: claudio.alvarez@ceaza.cl (C.A. Álvarez), paula.santana@uautonoma.cl (P.A. Santana).

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739468>

Received 9 September 2022; Received in revised form 7 March 2023; Accepted 9 March 2023

Available online 13 March 2023

0044-8486/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.