

RESPUESTA DEL SISTEMA CIRCADIANO HEPÁTICO AL ESTRÉS EN LA TRUCHA ARCO IRIS

Prieto Vázquez, L.; Naderi, F.
e- mail: lprieto@alumnos.uvigo.es

Trabajo Fin de Grado en Biología

Tutores:

- Jesús M. Míguez Miramontes

- Marcos A. López Patiño

Departamento de Biología

Funcional y Ciencias de la Salud

Facultad de Biología

Universidad de Vigo.

Resumen

El objetivo del presente trabajo de investigación fue conocer el efecto del estrés sobre el sistema circadiano hepático de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Para ello se evaluaron los ritmos de expresión de genes reloj en truchas control y en truchas sometidas a estrés causado por elevada densidad. Los resultados obtenidos demuestran que en una situación de estrés, el sistema circadiano hepático se ve afectado negativamente, presentando un desajuste en la expresión rítmica diaria de los genes reloj.

INTRODUCCIÓN

Ritmos biológicos y sistema circadiano

Una gran cantidad de cambios que ocurren en el medio ambiente tienen lugar de forma rítmica, pudiendo clasificarse esos ritmos en función de la duración de su periodo (ciclos día-noche, lunares o estacionales). En su mayoría se relacionan con los movimientos de rotación y traslación de la Tierra, que generan ciclos en diferentes variables ambientales. Entre ellos, los ciclos diarios de luz y oscuridad tienen gran incidencia en la fisiología y comportamiento de los organismos, que se ajustan a periodicidades cercanas a las 24 horas, recibiendo la denominación de circadianos (Refinetti, 2006).

Los animales perciben estos cambios, ante los cuales pueden responder de dos maneras. Por un lado, están las respuestas pasivas, que aparecen ante fluctuaciones rítmicas diarias y/o estacionales de una variable ambiental y desaparecen en su ausencia. Se denominan ritmos no endógenos y no aportan información adaptativa a los individuos. Por otro lado está la respuesta activa, que persiste incluso en ausencia de las condiciones ambientales que la han generado. Esta respuesta es debida a que los animales han podido desarrollar estrategias y mecanismos que les ayuden a sincronizarse en función del momento en el que se produce un evento, pudiendo incluso anticiparse a la llegada del mismo, lo que pudo suponer una gran ventaja evolutiva. Los ritmos generados a partir de una respuesta activa se conocen como endógenos y son generados por estructuras internas con funcionamiento autónomo que constituyen los relojes biológicos (Cardinali y Golombek, 1993). Los relojes son una parte fundamental del sistema circadiano y siempre están asociados a componentes de entrada (“inputs”) de la señal rítmica externa que es capaz de ajustar el mecanismo del reloj, así como vías de salida de la información del reloj o “outputs” (Aschoff, 1981).

Una señal capaz de influir en la actividad de un reloj biológico se conoce como *zeitgeber* (o “sincronizador”), ante la cual el ritmo generado mantiene una relación de fase estable, lo que asegura la correspondencia del tiempo biológico con el geológico (Zhdanova y Reebbs, 2006).

Los relojes biológicos se pueden definir como un conjunto de genes, presentes en una población determinada de células, cuya actividad ordena temporalmente las respuestas fisiológicas y los comportamientos de los seres vivos a lo largo de los días y de las estaciones.

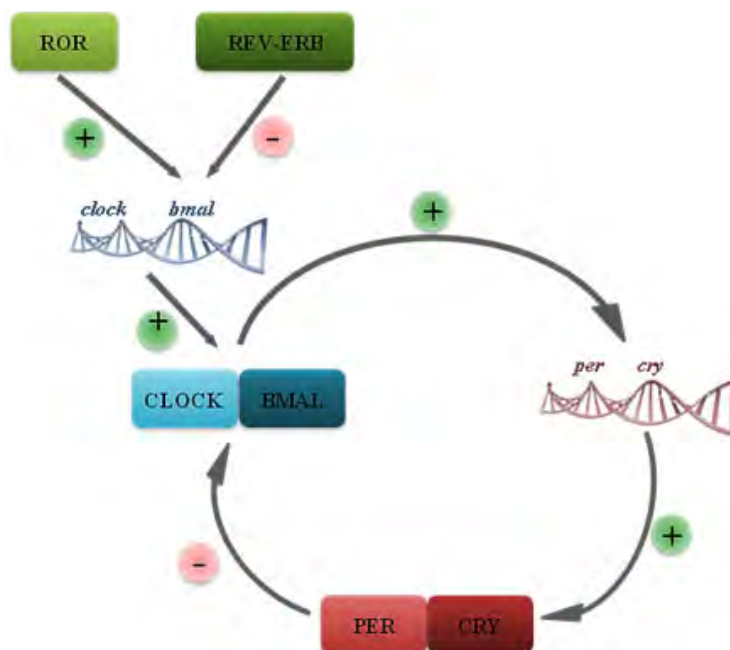


Figura 1: Esquema del funcionamiento de un reloj circadiano a nivel molecular. La transcripción de los genes que forman parte del reloj consta de un bucle principal formado por una rama positiva (*clock* y *bmal*) y una rama negativa (*per* y *cry*). El sistema se complementa con un bucle accesorio del que forman parte otra serie de genes (*ror* y *rev-erb*) que participan en la regulación del reloj.

El mecanismo molecular del sistema circadiano parece estar muy conservado filogenéticamente y es fácilmente identificable (Figura 1). Se basa en la existencia de bucles de retroalimentación entre los procesos de transcripción y transducción de los denominados “genes reloj” y sus productos proteicos (Panda *et al.*, 2002). El sistema se inicia con la expresión de los genes del bucle positivo de retroalimentación (*clock* y *bmal1*), cuyos productos proteicos se acumulan en el citoplasma celular para a continuación formar dímeros CLOCK/BMAL1 que migran al núcleo celular, donde se unen a promotores E-Box en los genes diana, que incluyen los del bucle negativo de retroalimentación, *per* y *cry*. La transcripción de estos últimos provoca un aumento de los niveles de sus productos proteicos (PER y CRY) que dimerizan (PER/CRY), lo que lleva a la inhibición del complejo CLOCK/BMAL1 (Kondratov, 2007).

El reloj circadiano se complementa con otro bucle autorregulado auxiliar que depende de receptores nucleares implicados en la modulación de diversos aspectos fisiológicos tales como el metabolismo de lípidos y carbohidratos (Chawla *et al.*, 2001; Burris 2008; Duez y Staels, 2009). Dicho bucle está constituido por las familias ROR y REV-ERB, las cuales tienen actividades transcripcionales opuestas (Giguère, 1999). En este sentido, los ritmos de expresión para ambos receptores nucleares en mamíferos muestran que *ror* se encuentra en fase con el bucle negativo del reloj (*per* y *cry*) mientras que *rev-erb* lo está con el bucle positivo (*clock* y *bmal*). Por tanto, la familia ROR activa la transcripción de *bmal*, mientras que la familia REV-ERB la inhibe, lo que las relaciona directamente con el oscilador circadiano (Cho *et al.*, 2012). Así, se ha evaluado la expresión de *rev-erb1 α* en el salmón del Atlántico, donde no es rítmica (Betancor *et al.*, 2014); en cambio, la de *rev-erb β* en la trucha arco iris sí que lo es (Hernández-Pérez, 2016).

Sistema circadiano hepático

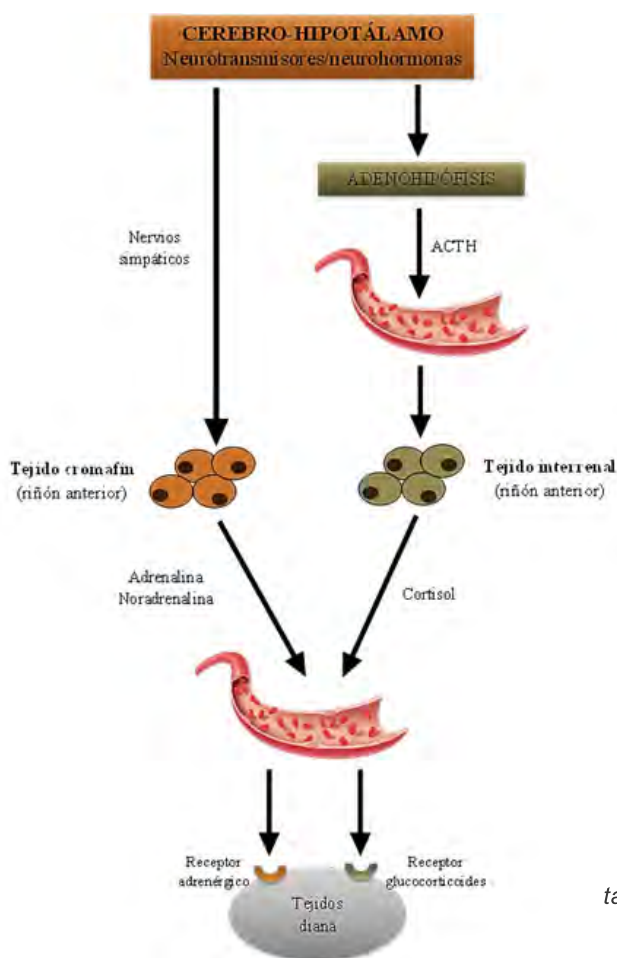
El sistema circadiano comprende elementos especializados en la recepción y transmisión de las señales externas al reloj biológico, el cual elabora señales rítmicas capaces de influir en las distintas actividades y funciones del organismo. En los mamíferos se describió inicialmente la existencia de un reloj localizado en el sistema nervioso central, capaz de modular todas las funciones rítmicas del organismo. Posteriormente

se descubrió la presencia de osciladores en tejidos periféricos, en base al conocimiento de los ritmos de expresión de genes reloj presentes en los mismos. Hoy en día se conoce la existencia de osciladores circadianos en tejidos centrales y periféricos la mayoría de especies de vertebrados estudiadas, incluidos los peces. Específicamente en la trucha arco iris, se ha descrito la presencia de osciladores circadianos en tejidos centrales, hipotálamo y retina neural (López-Patiño *et al.*, 2011) y tejidos periféricos, como el hígado (Hernández-Pérez, 2016).

La función del hígado incluye un gran abanico de procesos rítmicos tales como la regulación metabólica y la síntesis proteica (Davidson *et al.*, 2004). Independientemente de la existencia de un oscilador circadiano en el hígado, se sabe que más del 10% del transcriptoma hepático de mamíferos se expresa rítmicamente, incluidos los genes relacionados con el metabolismo hepático. Dada la presencia de un oscilador circadiano en esta localización se ha llegado a postular la interacción entre el sistema circadiano y el metabolismo hepático basada en señales moduladoras recíprocas (Li y Lin, 2015). Dicha interacción también parece darse en el hígado de los peces, tal y como apuntan los estudios realizados con el carpín (Azpeleta *et al.*, 2012).

El estrés en los peces

En la actualidad, las situaciones de estrés son consideradas como uno de los principales condicionantes de la producción en acuicultura, por lo que existe un creciente interés en conocer su naturaleza y los mecanismos fisiológicos que son afectados. El estrés puede definirse como una condición en la que un elemento potencialmente negativo puede alterar el equilibrio interno (homeostasis) del organismo. Dicho elemento, interno o externo, se conoce como “agente o estímulo estresante”, y se puede relacionar con los cambios físicos y químicos del agua, las interacciones biológicas con otros organismos, etc.



La presencia de un factor de estrés provoca cambios relativamente inmediatos en el organismo, de forma que se altera la homeostasis interna y se origina una respuesta fisiológica y comportamental para superar la amenaza y adaptarse a las nuevas condiciones. Para comprender mejor la respuesta fisiológica al estrés, se suelen diferenciar los componentes que participan en los distintos niveles de organización del individuo y que colectivamente constituyen la respuesta fisiológica integrada al estrés (Wendelaar Bonga, 1997). Así, se diferencian componentes primarios, secundarios y terciarios (Iwama *et al.* 2006; Pottinger, 2008). En los peces (Figura 2), la respuesta primaria conlleva la activación del eje hipotálámico-simpático-cromafín (HSC), la cual estimula la rápida liberación de catecolaminas (A, NA) al torrente sanguíneo (Wendelaar-Bonga, 1997; Gesto *et al.*, 2013).

Figura 2: Principales elementos neuroendocrinos involucrados en la respuesta al estrés en peces teleosteos, tanto en el eje HPC como en el eje HPI así como las respuesta del organismo a la señal de los principales mensajeros: cortisol y catecolaminas.

En paralelo, pero de forma más lenta, se activa la vía neuroendocrina de respuesta al estrés, el eje hipotalámico-hipófisis-tejido interrenal (HPI) (Wendelaar-Bonga, 1997) que a nivel hipotalámico implica la síntesis y liberación de neuropéptidos de la familia del CRF (*corticotropin-releasing factor*) (Flick *et al.*, 2006), cuya consecuencia es la estimulación de las células corticotropas de la hipófisis dando lugar a la liberación a la circulación de ACTH (*adenocorticotropin hormone*). La ACTH, a través de su unión a receptores de membrana del tipo melanocortina 2 (MCR2) en las células interrenales del riñón cefálico, estimula la síntesis y liberación de cortisol al torrente sanguíneo.

La activación de los ejes HSC y HPI causa el aumento plasmático de hormonas (catecolaminas y cortisol), que son señales clave durante la respuesta al estrés. Bajo estrés agudo, las catecolaminas se liberan rápidamente (segundos) al torrente sanguíneo, mientras que los niveles plasmáticos de cortisol tienden a aumentar paulatinamente para después descender de forma gradual hasta niveles basales varias horas después del cese del estrés (Gesto *et al.*, 2013). En cambio, durante un estrés crónico los niveles plasmáticos de cortisol continúan elevados, si bien el tipo de estrés, la especie, y su historial previo, entre otros factores, parecen influir en la dinámica hormonal (Aluru y Vijayan, 2009; Gesto *et al.*, 2013). La baja tasa de conversión del cortisol (se transforma en cortisona) y la existencia de métodos relativamente sencillos para su cuantificación hacen que este parámetro sea muy utilizado para definir una situación de estrés fisiológico en peces (Wendelaar Bonga, 2011).

Se ha demostrado en mamíferos la existencia de ritmos en ciertos componentes del eje endocrino que regula la síntesis y secreción de glucocorticoides, tanto a nivel de CRF hipotalámico, como de ACTH hipofisaria y de la propia ruta de síntesis de cortisol. Así, se ha especulado con la idea de que el ritmo diario de cortisol se correlaciona con el de actividad del animal, dado que en animales diurnos la acrofase del ritmo de cortisol plasmático se da al final de la noche, mientras que en los nocturnos se observa al final del día (Mohawk *et al.*, 2005; Montoya *et al.*, 2010).

El cortisol actúa como mediador de los cambios más destacados ocasionados por la exposición a estrés. En este sentido, la fisiología hepática también sufre modificaciones que no solo afectan a las funciones metabólicas llevadas a cabo por este órgano, sino que también a su fisiología rítmica diaria, habida cuenta de que el tratamiento con glucocorticoides provoca cambios de fase en la expresión de determinados genes reloj (Sánchez-Bretaño *et al.*, 2015). No obstante se desconoce todavía tanto la naturaleza de los cambios como los mecanismos a través de los cuáles se llevan a cabo. Por este motivo, el principal objetivo del presente trabajo fue evaluar el potencial efecto negativo del estrés sobre el sistema circadiano hepático en un animal utilizado como modelo de pez teleosteo, como es la trucha arco iris.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales y mantenimiento

Se utilizaron ejemplares de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) con un peso de 80 ± 5 g, mantenidos bajo condiciones estándar (temperatura del agua de 13.5 ± 0.5 °C, fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, alimentación 1% del peso corporal a ZT2). ZT= *zeitgeber time*, se denomina al tiempo en que se produce un estímulo capaz de sincronizar un ritmo biológico, de modo que ZT0 se corresponde con el inicio de la fase de luz del fotociclo diario.

Diseño experimental

Con objeto de evaluar el efecto del estrés sobre el sistema circadiano hepático de la trucha arco iris se emplearon dos cohortes de animales que fueron sometidas a diferentes condiciones experimentales (grupos Control y Estrés). La primera cohorte, Control, fue mantenida en las mismas condiciones que durante su periodo de aclimatación. Pasadas 72 horas tras el inicio del experimento se procedió al

sacrificio de los peces a distintos intervalos de tiempo (cada 4 horas) a lo largo de un ciclo completo de 24 horas, comenzando con el inicio de la fase de luz (ZT0), por lo que los puntos de muestreo fueron los siguientes: ZT0, ZT4, ZT8, ZT12, ZT16, ZT20 y ZT0' (día siguiente).

La segunda cohorte (Estrés) de truchas se mantuvo en las mismas condiciones que la anterior durante al menos 2 semanas, tras lo cual los peces fueron expuestos a una situación de estrés (densidad elevada: 70 kg de pez/m³), para lo cual se redujo el nivel de agua de cada uno de los tanques. Esta situación se mantuvo durante 72 horas antes de proceder a su sacrificio, en los mismos intervalos de tiempo que el grupo control.

Para la toma de todas las muestras se siguió un único procedimiento para todos los animales. Antes de proceder al sacrificio de los peces, estos fueron anestesiados con 2 fenoxietanol al 0.2%, diluido directamente en los tanques que los contenían. A continuación se sacrificó a los animales mediante decapitación, procediéndose a la toma de muestras de hígado con ayuda de material estéril. Dichas muestras fueron inmediatamente congeladas en hielo seco y almacenadas a -80°C hasta su posterior procesado para la cuantificación de la expresión de genes reloj (*clock1a*, *bmal1*, *per1* y *rev-erbβ*) mediante qRT-PCR.

Para evaluar la expresión de genes reloj se extrajo el RNA total de cada muestra de hígado usando el método TRIzol (Gibco BRL). La cantidad y calidad del RNA extraído fueron determinadas mediante técnicas espectrofotométricas (NanoVue Plus) a 260 y 280 nm. A continuación, se procedió a la síntesis del DNA complementario a partir de 2 µg de RNA de cada muestra. La expresión de los genes mencionados se realizó mediante qRT-PCR, usando 1 µl del DNA previamente obtenido, al que se añadió 14 µl de solución MIX (7.5 µl de SYBR Green Master Mix, 4.5 ml de agua grado MQ estéril y 1 µl de cada uno de los cebadores, forward y reverse). Se cuantificó la expresión de *clock1α*, *bmal1*, *per1*, *rev-erbβ*, tomando como referencia la de *β-actina*, cuya expresión fue estable independientemente de las condiciones experimentales.

Análisis estadístico de los resultados

Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de doble vía, siendo “tiempo” y “condición” las variables independientes. En caso de existir diferencias significativas entre grupos se realizó un análisis de comparaciones múltiples (Student-Newman-Keuls). Los datos fueron expresados como el promedio ± error estándar de la media (n = 5/grupo). El grado de significación se estableció en P < 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Muchos de los procedimientos llevados a cabo con los peces en acuicultura pueden causar estrés (ya sea de forma aguda o crónica) cuya consecuencia inmediata es una alteración de su bienestar, provocando un descenso de la producción (Conte, 2004) e influyendo negativamente en la economía de la explotación. El efecto del estrés puede ser evaluado desde diferentes puntos de vista. En nuestro caso, este efecto se ha evaluado sobre el hígado dado su papel como principal órgano relacionado con el metabolismo y teniendo en cuenta además la existencia de estudios previos que demuestran que las situaciones de estrés alteran los ritmos diarios de expresión de las enzimas más importantes del metabolismo de carbohidratos y de lípidos (Hernández-Pérez *et al.*, 2015). Estos cambios en los ritmos del metabolismo hepático podrían ser una consecuencia de la alteración sufrida por el sistema circadiano de este tejido, que a su vez dirige y/o modula los ritmos de los componentes de las rutas metabólicas.

El ritmo diario de expresión de genes reloj pertenecientes al bucle principal (*clock1a*, *bmal1*, *per1*) y accesorio (*rev-erb β*) en hígado de trucha arco iris, así como el efecto del estrés sobre los mismos se muestra en la Figura 3. La expresión de *clock1a* mostró un claro ritmo diario en peces control, con valores

máximos durante la transición luz-oscuridad (ZT12) y basales al inicio del día (ZT0). La expresión media fue 2.5 ± 0.2 unidades relativas. El estrés provocó un descenso significativo en la amplitud del ritmo, que se tradujo en un descenso del valor medio de la misma próximo al 40 % (hasta 1.5 ± 0.1 unidades relativas) con respecto al grupo control. Algo similar ocurrió con la expresión de *bmal1*, cuyo pico de expresión se observó en ZT12 en ambos grupos experimentales (control y estrés), si bien la magnitud de dicho incremento fue menor en las truchas estresadas que en las control, lo que se tradujo en un descenso aproximado del 25 % en la expresión media (1.7 ± 0.1 unidades relativas, vs. 2.3 ± 0.2 unidades relativas en el grupo control).

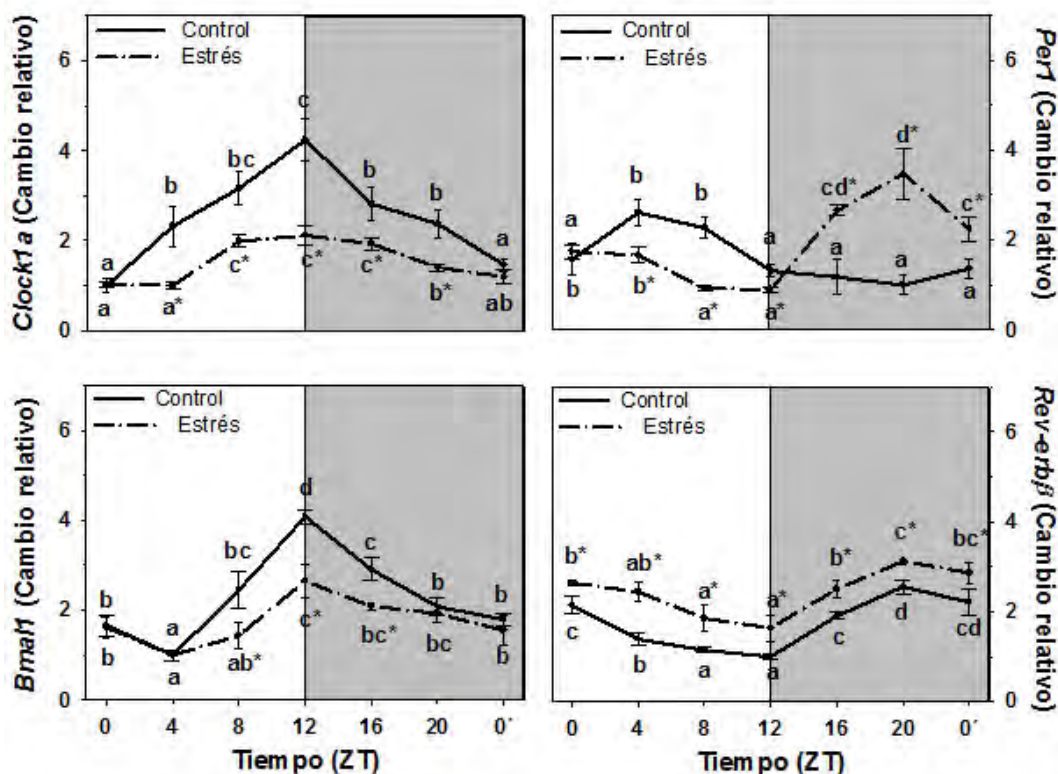


Figura 3: Ritmo diario de expresión hepática de los genes reloj *clock1a*, *bmal1*, *per1* y *rev-erbβ* en truchas arco iris expuestas (línea discontinua) o no (línea continua) a estrés por densidad. Cada valor representa la media \pm e.e.m. (n=5/grupo). Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre intervalos de tiempo dentro de un mismo grupo. * $P < 0.05$ respecto del grupo control en el mismo intervalo de tiempo. La banda sombreada corresponde a la fase oscura del fotoperiodo diario.

La expresión de *per1* en peces Control mostró un ritmo diario con valores máximos al inicio del día (ZT4) y basales durante la noche (ZT20). La expresión media del gen en este grupo fue 1.6 ± 0.1 unidades relativas. El estrés provocó un cambio tanto en el perfil como en la amplitud de dicho ritmo. Así, se produjo un desplazamiento de 8 horas en el pico de expresión (ZT20) respecto al grupo Control y un ligero aumento de la expresión media (1.9 ± 0.2 unidades relativas), aproximadamente un 20% respecto a lo observado en los peces no estresados.

A la vista de estos resultados se puede decir que el estrés por densidad no afectó al perfil rítmico descrito por *clock1a* y *bmal1* (cuyo máximo de expresión se mantuvo en la misma ventana temporal), pero sí redujo bruscamente su amplitud. Por su parte, *per1* sufrió un desplazamiento de 8 horas en su pico de expresión respecto a lo observado en peces no estresados. Estos resultados coinciden con lo descrito previamente en el hígado de mamíferos (Takahashi *et al.*, 2013). Por tanto, se puede concluir que el sistema circadiano hepático y su fisiología rítmica se encuentran alterados por el estrés en la trucha arco iris. No obstante, los mecanismos a través de los cuales se produce dicho efecto no están claros. Uno de ellos podría ser la unión de cortisol (cuyos niveles están elevados durante la exposición a estrés) a sus

receptores hepáticos que, una vez activos, podrían modular la transcripción de determinados genes (Pratt, 1993; Jewell *et al.*, 1995), entre los cuales podrían encontrarse los genes reloj.

Otro posible mediador en el efecto del estrés sobre el sistema circadiano hepático es el gen *rev-erb β* , miembro (junto con *ror*) de un bucle auxiliar del reloj. Este gen modula aspectos fisiológicos del metabolismo hepático, e influye también sobre la transcripción de *bmal*, inhibiéndola, por lo que en presencia de niveles elevados de *rev-erb β* disminuye la expresión de *bmal1*. Nuestros resultados concuerdan con esta idea, dado que el ritmo de *rev-erb β* en truchas control (Figura 3) mostró valores máximo que se alcanzaron durante la segunda mitad de la noche (ZT20), siendo su expresión media de 1.8 ± 0.1 unidades relativas. Aunque el estrés no alteró el perfil rítmico, sí causó un aumento de la expresión en todos los intervalos de tiempo analizados, con lo que la expresión media (2.4 ± 0.1 unidades relativas) aumentó cerca de un 30 % con respecto al Control. Por tanto, el aumento de los niveles medios de *rev-erb β* durante el estrés podría ser responsable del descenso de los de *bmal1*, lo que llevaría a especular con la hipótesis del receptor nuclear mediando en el efecto del estrés sobre el sistema circadiano hepático de la trucha arco iris. Los estudios preliminares apoyan esta hipótesis, dado que el tratamiento con un antagonista de los receptores de glucocorticoides (mifepristona) evita el incremento de la expresión de *rev-erb β* debido al estrés, si bien revelan que la expresión del receptor nuclear podría estar modulada directamente por el cortisol, a través de sus receptores (datos no mostrados). Esto implicaría al cortisol y al receptor nuclear como mediadores del efecto del estrés sobre el sistema circadiano hepático, actuando específicamente sobre *bmal1*.

Finalmente, estudios recientes apuntan a la familia de las sirtuinas como posible mediador del efecto del estrés (Asher *et al.*, 2008). Los miembros de esta familia son capaces de deacetilar histonas, así como de interactuar con reguladores transcripcionales, lo que les facilita su interacción con el sistema circadiano, bien a través de su dependencia del cofactor NAD⁺ (cuya síntesis se produce de forma rítmica), la cual condiciona la actividad de las sirtuinas, o bien mediante su acción directa sobre el bucle principal del oscilador celular, siendo necesaria la presencia de *Sirt1* para que se produzca la transcripción de *bmal1*, *per2* y *cry1* (Asher *et al.*, 2008). *Sirt1* se une a BMAL en el dímero CLOCK/BMAL (Nakahata *et al.*, 2008, 2009) y también a *per2*, inactivándolos mediante su deacetilación (Asher *et al.*, 2008). A nivel periférico, se ha descrito este mismo efecto en el hígado, donde *Sirt1* afecta a los genes reloj del tejido hepático (Nogueiras *et al.*, 2012). Nuestros estudios previos revelan el aumento de la expresión de *sirt1* hepática en las truchas estradas (Hernández-Pérez, 2016), lo que concuerda con el papel mediador de *Sirt1* durante la respuesta al estrés en esta especie. Futuros diseños experimentales permitirán confirmar dicha idea.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el estudio permiten elaborar las siguientes conclusiones:

- El estrés crónico inducido en la trucha arco iris por la elevada densidad de peces en los tanques conlleva una serie de cambios a nivel hepático. En esta situación potencialmente adversa, el sistema circadiano presente en dicho tejido se encuentra negativamente afectado, lo que implica el desajuste de la fisiología rítmica diaria del órgano.
- Entre los posibles mediadores intracelulares solo ha sido evaluado *rev-erb β* el cual muestra cambios consistentes con la hipótesis de su mediación en el efecto del estrés sobre la fisiología rítmica hepática. Este miembro del bucle accesorio autorregulado que se acopla al sistema circadiano, bien mediante su acción directa o a través de su interacción con otros posibles mediadores (cortisol y *sirt1*), podría modular la expresión de *bmal1*, lo que causaría el desajuste del oscilador hepático en la trucha arco iris.

BIBLIOGRAFÍA

- Aluru, N., Vijayan, M.M. (2009). Aryl hydrocarbon receptor activation impairs cortisol response to stress in rainbow trout by disrupting the rate-limiting steps in steroidogenesis. *Endocrinology*. 147: 1895-1903.
- Aschoff, J. (1981). A survey of biological rhythms. *Handbook of behavioral neurobiology*. Aschoff, J (Ed.) Plenum Press, New York, pp. 3-10
- Asher, G., Gatfield, D., Stratmann, M., Reinke, H., Dibner, C., Kreppel, F., Mostoslavsky, R., Alt, F.W., Schibler, U. (2008). SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation. *Cell*. 134: 317-328.
- Azpeleta, C., Sánchez-Bretaño, A., Isorna, E., Nisembaum, L.G., Velarde, E., De Pedro, N., Alonso-Gómez, A.L., Delgado, M.J. (2012). Understanding the circadian system as a net of clocks: daily expression of clock genes in the hypothalamus-pituitary-interrenal axis in *Carassius auratus*. En: Delgado, M.J., Alonso-Gómez, A.L., De Pedro, N., Isorna, E. (Eds.). *Avances en endocrinología comparada*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, pp. 37-40.
- Betancor, M.B., McStay, E., Mineghetti, M., Migaud, H., Tocher, D.R., Davie, A. (2014). Daily rhythms in expression of genes of hepatic lipid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *PLoS One*. 9: e106739.
- Burris, T.P. (2008). Nuclear hormone receptors for heme: REV-ERB α and REV-ERB β are ligand-regulated components of the mammalian clock. *Mol. Endocrinol.* 22 (7): 1509-1520.
- Cardinali, D.P., Golombek, D.A. (1993) Melatonin accelerates reentrainment after phase advance of the light-dark cycle in syrian hamsters: Antagonism by flumazenil. *Chronobiol. Int.* 10:435-441.
- Chawla, A., Repa, J.J, Evans, R.M., Mangelsdorf, D.J. (2001). Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science*. 294 (5548): 1866-1870.
- Cho, H., Zhao, X., Hatori, M., Yu, T.T., Barish, G.D., Lam, M.T., Chong, L., DiTacchio, L., Atkins, A.R., Glass, C.K., Liddle, C., Auwerx, J., Downes, M., Satchidananda Panda, S., Evans, R.M., (2012). Regulation of circadian behavior and metabolism by rev-erba and rev-erb β . *Nature*. 485: 123-127.
- Conte, F.S. (2004) Stress and the welfare of cultured fish. *Appl. An. Behav. Sci.* 86: 205-223.
- Davidson, A. J., Castañón-Cervantes, O., Stephan, F.K. (2004). Daily oscillations in liver function: diurnal vs circadian rhythmicity. *Liver Int.* 24: 179-186.
- Duez, H., Staels, B. (2009). Rev-erba: an integrator of circadian rhythms and metabolism. *J. Appl. Physiol.* 107 (6): 1972-1980.
- Flik, G., Klaren, P., Van den Burg, E., Metz, J., Huising, M. (2006). CRF and stress in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 146: 36-44.
- Gesto, M., López-Patiño, M., Hernandez, J., Soengas, J., Míguez, J. (2013). The response of brain serotonergic and dopaminergic systems to an acute stressor in rainbow trout: a time course study. *J. Exp. Biol.* 216: 4435-4442.
- Giguère, V. (1999). Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr. Rev.* 20: 689-725.
- Hernández-Pérez, J., Míguez, J.M., Librán-Pérez, M., Otero-Rodiño, C., Nahderi, F., Soengas, J.L., López-Patiño, M.A. (2015). Daily rhythms in activity and mRNA abundance of enzymes involved in glucose and lipid metabolism in liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Influence of light and food availability
Chronobiol. Int. 32: 1391-1408.
- Hernández-Pérez, J. (2016) Sistema circadiano y metabolismo hepático en la trucha arco iris. Influencia del estrés. Tesis doctoral. Universidad de Vigo.
- Iwama, G.K., Afonso, L.O.B., Vijayan, M.M. (2006) Stress in fishes. En: *Physiology of fishes*. Evans, D.H., Claiborne, J.B. Taylor and Francis, USA. pp. 319-342.
- Jewell, C.M., Webster, J.C., Burnstein, K.L., Sar, M., Bodwell, J.E., Cidlowski, J.A. (1995) Immunocytochemical analysis of hormone mediated nuclear translocation of wild type and mutant glucocorticoid receptors. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 55: 135-46.

- Kondratov, R.V. (2007). A role of the circadian system and circadian proteins in aging. *Ageing Res. Rev.* 6: 12-27.
- Li, S., Lin, J.D. (2015). Transcriptional control of circadian metabolic rhythms in the liver. *Diabetes Obes. Metab.* 17: 33-38.
- López Patiño, M.A., Rodríguez-Illamola, A., Conde-Sieira, M., Soengas, J.L., Míguez, J.M. (2011). Daily rhythmic expression patterns of clock1a, bmal1, and per1 genes in retina and hypothalamus of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Chronobiol. International.* 28(5): 381-389.
- Mohawk, J. (2005). Inhibiting cortisol response accelerates recovery from a photic phase shift. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288: R221-R228.
- Montoya, A., López-Olmeda, J., Garayzar, A., Sánchez-Vázquez, F. (2010). Synchronization of daily rhythms of locomotor activity and plasma glucose, cortisol and thyroid hormones to feeding in Gilthead seabream (*Sparus aurata*) under a light-dark cycle. *Physiology & Behavior.* 101: 101-107.
- Nakahata, Y., Kaluzova, M., Grimaldi, B., Sahar, S., Hirayama, J., Chen, D., Guarente, L.P., Sassone-Corsi, P. (2008) The NAD⁺-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control. *Cell.* 134: 329-340.
- Nakahata, Y., Sahar, S., Astarita, G., Kaluzova, M., Sassone-Corsi, P. (2009) Circadian control of the NAD⁺ salvage pathway by CLOCK-SIRT1. *Science.* 324: 654-657.
- Nogueiras, R., Habegger, K.M., Chaudhary, N., Finan, B., Banks, A.S., Dietrich, M.O., Horvath, T.L., Sinclair, D.A., Pfluger, P.T., Tschöp, M.H. (2012) Sirtuin 1 and sirtuin 3: physiological modulators of metabolism. *Physiol Rev.* 92: 1479-1514.
- Panda, S., Antoch, M.P., Miller, B.H., Su, A.I., Schook, A.B., Straume, M., Schultz, P.G., Kay, S.A., Takahashi, J.S., Hogenesh, J.B. (2002). Coordinated transcription of key pathway in the mouse by the circadian clock. *Cell.* 109: 307-320.
- Pottinger, T.G. (2008). The stress response in fish – Mechanisms, effects and measurements. En: Branson E.J. (Ed.). *Fish Welfare*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, pp. 32-48.
- Pratt, W.B. (1993). The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 268: 21455-21458.
- Refinetti, R. (2006). *Circadian Physiology*. Taylor and Francis (Eds.). CRC. Press, Inc. Boca Ratón, Florida.
- Sánchez-Bretaño, A., Callejo, M., Montero, M., Alonso-Gómez, Á., Delgado, M., Isorna, E. (2015). Performing a hepatic timing signal: glucocorticoids induce gper1a and gper1b expression and repress gclock1a and gbmal1a in the liver of goldfish. *J. Comp. Physiol. B*, 186: 73-82.
- Takahashi, K., Yamada, T., Tsukita, S., Kaneko, K., Shirai, Y., Munakata, Y., Ishigaki, Y., Imai, J., Uno, K., Hasegawa, Y., Sawada, S., Oka, Y., Katagiri, H. (2013) Chronic mild stress alters circadian expressions of molecular clock genes in the liver. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 304: E301-309.
- Wendelaar Bonga, S.E. (1997). The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77: 591-625.
- Wendelaar Bonga, S.E. (2011). Hormonal responses to stress. En Anthony, P.F. (Ed.) *Encyclopaedia of Fish Physiology*. Academic Press, San Diego, USA. Pp 1515-1523.
- Zhdanova, I.V., Reeb, S.G. (2006). Circadian rhythms in fish. En: Sloman, K.A., Wilson, R.W., Balshine, S. (Eds.). *Behaviour and physiology of fish*. Amsterdam: Elsevier Academic Press. Pp 197-228.