

Aprendiendo de los peces

Ana del Pozo Cano

Departamento de Neurociencia, Biomedical Center (BMC), Universidad de Uppsala, Suecia
ana.delpozo@neuro.uu.se

LA TESIS

Durante la licenciatura de Biología que cursé en la Universidad de Murcia, quedé fascinada por la cronobiología, ciencia que estudia las variaciones rítmicas que se producen en casi todos los organismos, desmantelando el carácter constante de las variables biológicas. Casi todos los parámetros biológicos que tienen lugar en los organismos ocurren rítmicamente (no constantemente). La ritmicidad de estos procesos, que puede ser clasificada de acuerdo a su periodo como diaria, mensual, anual, etc., está controlada por un reloj interno que proporciona a los organismos información temporal. Sin embargo, este reloj interno muestra un pequeño desfase con el periodo de los fenómenos cíclicos ambientales, por lo que tiende naturalmente a adelantarse o atrasarse. Son estas señales cíclicas externas las responsables de sincronizarlos al periodo adecuado (Figura 1), siendo los ciclos de luz y oscuridad considerados primordiales. Así, por ejemplo, los animales no presentan actividad continuamente a lo largo de las 24 h del día, sino que se clasifican en animales diurnos, nocturnos y crepusculares.

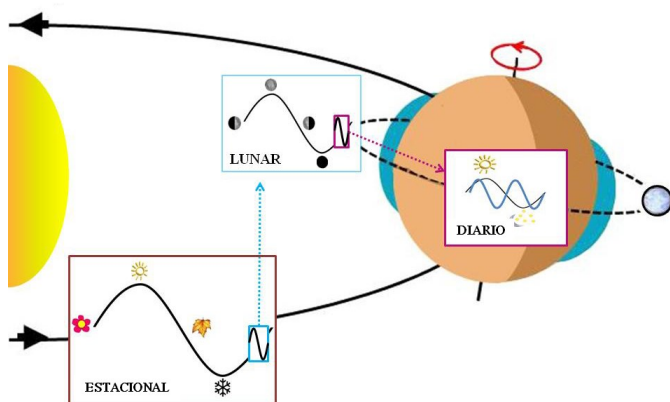


Figura 1. Ciclos geofísicos diarios, lunares y estacionales. Los ciclos geofísicos tales como la traslación de la Tierra alrededor del sol, la traslación de la Luna alrededor de la Tierra, y la rotación de la Tierra sobre su propio eje, generan ciclos con diferentes periodos: estacional ($\tau \approx 365$ días), lunar- mensual ($\tau \approx 28$ días), diario ($\tau \approx 24$ h) and mareal ($\tau \approx 12$ h), estando contenidos los más cortos en los más largos. (Modificado de del Pozo et al., 2012).

El descubrimiento de esta disciplina despertó mi curiosidad y me llevó a colaborar en proyectos de investigación como alumna interna dentro del grupo de cronobiología de peces de esa misma facultad, consiguiendo algo después, una Beca de Colaboración del Ministerio de Educación y Ciencia (MEC). Dado que la inteligencia de los peces es a menudo menospreciada, la primera pregunta que salta a la mente es ¿por qué investigar sobre estos animales? Sin embargo, los peces no solo son inteligentes sino que muestran una gran similitud con el resto de los vertebrados, incluyendo a los humanos. De esta forma, pueden servir como modelo para otras especies de peces y hasta para el ser humano, con la ventaja de presentar una inmensa variabilidad biológica, que les permite adaptarse a una gran diversidad de nichos. Esta pluralidad se debe a que poco después de surgir este grupo durante la evolución, su código genético se multiplicó, lo que les permitió adquirir una copia extra de cada gen (en relación con la dotación de los demás grupos de vertebrados) con la que la evolución pudo “experimentar”, consiguiendo adaptaciones variopintas. Desde un punto de vista más industrial, la acuicultura es un sector fuerte en España, que consume y exporta una cantidad importante de pescado. Especialmente la lubina es una de las especies más comercializada en el Mediterráneo y sobre la que recae un importante interés económico. Conocer mejor su biología podría llevar a una mejora en su calidad de producción y una reducción de los costes, beneficiando la creciente industria de la acuicultura en nuestro país y Europa.

Una vez acabada la carrera, conseguí la Ayuda de Inicio a la Investigación que hizo de puente hasta que empecé la tesis doctoral con una beca-contrato pre-doctoral por 4 años, ambas de la **Universidad de Murcia**. La decisión de embarcarme en la tesis doctoral no fue muy complicada, ya que esta me brindaba la oportunidad de desarrollar mi curiosidad, adquirir formación muy completa en cuanto a organización y manejo de un proyecto, enseñanza, técnicas de laboratorio y de campo, pero también destrezas personales de superación, resolución de problemas, adaptación a diferentes ambientes de trabajo, y experiencia en el extranjero, entre otras. Así, continué en el campo de la cronobiología de peces para desarrollar mi tesis doctoral, bajo la supervisión del Prof. F. Javier Sánchez Vázquez y la

Dra. M. Luisa Vera Ándujar. Durante la misma, estudié los ritmos de comportamiento, fisiología y expresión genética en dos especies de peces muy diferentes, la lubina y en el pez cebra. La lubina es un pez marino de interés comercial, que ha sido investigado ampliamente en cuanto a lo nutrición y reproducción. Desde un punto de vista cronobiológico, la lubina adquiere protagonismo debido a sus inversiones estacionales de comportamiento, alimentándose por la noche en invierno, y por el día el resto del año (Figura 2). Este efecto ha sido bien documentado en el medio natural así como en condiciones de laboratorio que simulan las naturales. Incluso se han observado cambios espontáneos de fase solo en algunos individuos mantenidos bajo idénticas condiciones controladas y constantes de laboratorio. No obstante, se desconocen los mecanismos internos que conducen este dualismo en el comportamiento. Durante mi tesis, nos propusimos aportar algún conocimiento al respecto.

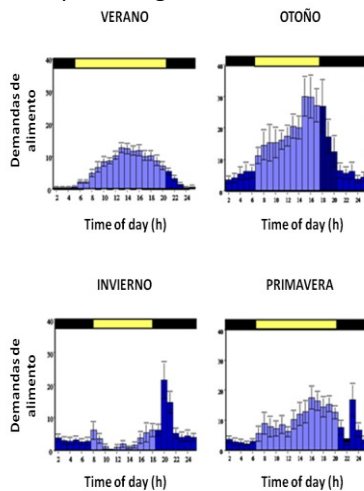


Figura 2. Demandas de alimento de grupos de lubinas en cada estación, mostrando inversiones de fase estacionarias. En el eje vertical se muestra las demandas de alimento, mientras que en el horizontal se representa la hora del día (en horas). Las barras amarillas y negras sobre las gráficas indican la fase de luz y oscuridad, respectivamente. (Modificado de Sanchez-Vazquez et al., 1998).

Debido a que los ritmos biológicos no son exclusivos del comportamiento, sino que existen a todos los niveles de organización (molecular, celular, fisiológico...), ritmos en niveles inferiores podrían estar controlando el comportamiento dual. Como se ha comentado previamente, los organismos poseen relojes internos que les proporcionan información temporal. La maquinaria de estos relojes está basada en un conjunto de genes, llamados genes reloj, que se expresan rítmicamente en consonancia con las señales ambientales cíclicas. Por tanto, estos genes reloj que orquestan el reloj molecular interno de los organismos, se posicionan como candidatos relevantes para dirigir esta inversión estacional en los ritmos de alimentación de la lubina.

Desafortunadamente, solo uno de estos genes reloj (llamado *period1*, "*per1*") había sido descrito en la lubina, por lo que comenzamos la búsqueda de otros genes reloj, identificando dos criptocromos (genes "*cry1* and *cry2*"). Todos ellos se expresan en todos los tejidos estudiados pero siguiendo patrones temporales distintos, apoyando así la teoría de que, como en otras especies, la lubina posee varios relojes periféricos además del reloj central (en el cerebro), que pueden ser sincronizados de forma diferente. Hace no muchos años, se pensaba que los organismos poseían tan solo un reloj interno localizado en el cerebro, que controla todos los ritmos biológicos en consonancia con los ciclos de luz/oscuridad. Sin embargo, cada vez queda más claro que este reloj interno en el cerebro está acompañado de muchos otros relojes en tejidos periféricos, que pueden ser controlados por los ciclos de luz/oscuridad o por otras señales cíclicas externas, pudiendo presentar ritmicidades diferentes.

Uno de estas señales que también son capaces de sincronizar los ritmos biológicos son los ciclos de alimentación. Esta sincronización al alimento de comportamiento alimenticio y locomotor, así como de fisiología digestiva e incluso de expresión génica, permite a los animales pueden predecir la siguiente ingesta y preparar su organismo, mejorando su capacidad de capturar el alimento así como de asimilar los nutrientes. Nosotros demostramos que la restricción a una fase determinada del día en la recompensa de alimento bajo un sistema de libre demanda, provoca el ajuste de la actividad alimenticia a dicha fase, acompañado de cambios en la expresión de genes reloj en órganos directamente relacionados con la alimentación (pero no en el cerebro) y cambios fisiológicos en algunos parámetros digestivos pero no en la glucemia.

Esta rigidez en los ritmos de glucosa, nos llevó a investigar las diferencias en los ritmos de glucosa en sangre en lubinas que se alimentan por el día y de aquellas que lo hacen por la noche bajo las inversiones naturales de comportamiento alimenticio. Esta vez observamos los niveles de glucosa en sangre son más elevados durante la respectiva fase de alimentación en ambas inversiones estacionales, incrementando los niveles medios solo en las lubinas nocturnas en invierno. La glucosa no interviene solo como parte de procesos digestivos, sino que participa en más procesos biológicos (Figura 3). Se ha visto que la glucosa se encuentra elevada durante la alimentación nocturna invernal y la reproducción, que también tiene lugar exclusivamente en las noches de invierno. El hipotético role de la glucosa como señal desencadenante para dichos procesos en lugar de un mero metabolito resultante de la alimentación, encajaría también con el hecho de que sus niveles en sangre no se vean modificados por inversiones de alimentación forzadas, pero si cuando estas inversiones coinciden con el periodo de puesta.

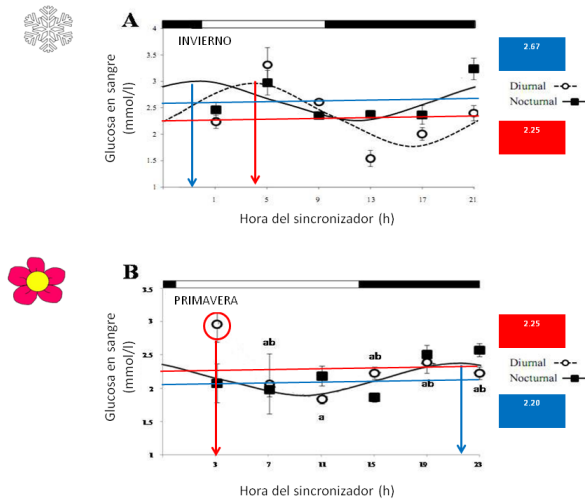


Figura 3. Ritmo diario de niveles de glucosa en sangre en invierno (a) y primavera (b) durante ambas inversiones de comportamiento alimenticio. Cada punto representa la media de los niveles de glucosa en sangre de 5 lubinas de alimentación diurna (círculos blancos) y nocturna (cuadros negros). El ajuste del ritmo ($p < 0.03$) está representado por la línea sinusoidal punteada para los peces diurnos, y continua para los nocturnos. Letras diferentes denotan diferencias entre puntos del día (ANOVA 1, $p < 0.03$). El eje vertical muestra los niveles de glucosa en sangre (mmol/l) mientras que el horizontal representa el tiempo del sincronizador (en horas). (Modificado de del Pozo et al., 2012).

Nosotros hipotetizamos que los ritmos de reproducción y alimentación podrían estar dirigidos por dos marcapasos distintos pero asociados: uno que controla la configuración diurna, u otro que controla la reproducción estacional nocturna. Cuando ambos están acoplados, se expresa la configuración diurna; sin embargo, cuando alguna señal externa, o más probablemente interna (como podría ser la glucosa en sangre, u otra), los desacopla, permite la configuración nocturna (Figura 4). Sistemas similares de múltiples marcapasos han sido propuestos para otros fenómenos estacionales que modifican la fase de comportamiento, como la migración de aves.



Figura 4. Esquema del sistema de marcapasos múltiple que modifica su configuración estacionalmente. Así se presentan acoplados (panel izquierdo) cuando el mayor peso de la ritmicidad recae sobre el marcapasos diurno; mientras que durante la estación reproductora nocturna, se desacoplan, mediado por algún tipo de señal externa o interna (como podría ser la glucosa), mostrando configuración nocturna. (Modificado de del Pozo et al., 2012).

Por otro lado, el pez cebra es un pequeño pez de agua dulce, común en acuariología, pero que ha llegado a imponerse como una de las especies modelo más importantes en un amplísimo número de disciplinas, entre ellas la nutrición (apetito y obesidad). Hasta ahora, sus ritmos de alimentación permanecían inexplorados. Esto se debe, en parte, a que los sistemas de alimentación usados para analizar ritmos alimenticios en peces presentaban restricciones en cuando al tamaño de los individuos. Estos sistemas de alimentación son los denominados comederos a demanda, que permiten a los peces reclamar alimento cuándo y cuánto quieran, por medio de la activación de un sensor de demanda. Tradicionalmente, estos sensores requerían cierta fuerza por parte de los peces, consistiendo en palancas rígidas que tenían que ser empujadas (normalmente con la cola), o cuerdas flexibles para ser mordidas y estiradas (Figura 5). El pez cebrilla tiene un tamaño máximo de 6 cm, por lo que carece de fuerza para emplear cualquiera de los sistemas mencionados. Por ello, nosotros desarrollamos un novedoso sistema que incorpora sensores infrarrojos como sensores de demanda. Así el pez solo tiene que interrumpir el haz infrarrojo con su cuerpo para activar el comedero y recibir la recompensa de alimento.

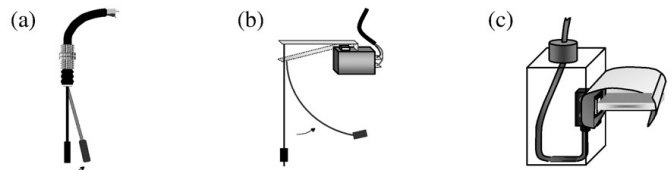


Figura 5. Diferentes sensores para comederos a demanda. (A) Palanca rígida que se activa empujándola, (B) palanca flexible cuya activación es estirándola, (C) sensor infrarrojo que se activa mediante interrupción del haz. (Modificado de Boluda-Navarro et al., 2009).

Gracias a este sistema, los peces cebrilla mostraron un robusto ritmo diurno de locomoción (como había sido reportado anteriormente), pero acompañado de un ritmo de alimentación nocturno, concentrado durante las 4 últimas horas de la noche (Figura 6). Generalmente ambos ritmos permanecieron en fases diferentes (día vs. noche), siendo capaces de adaptar sus demandas cuando se les restringe el horario de la recompensa, manteniendo la actividad locomotora siempre diurna.

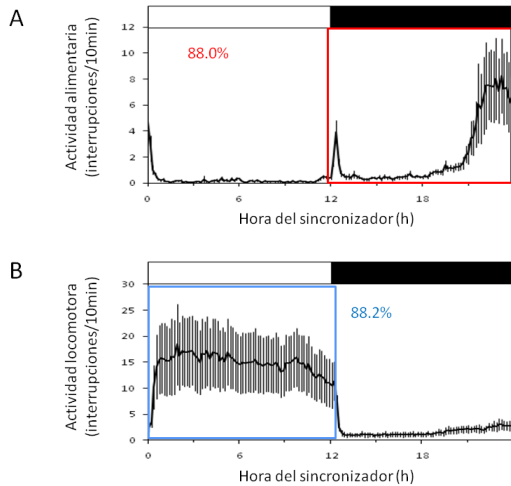


Figura 6. Ondas medias de actividad alimentaria (A) y locomoción (B) de todos los acuarios durante la alimentación a demanda. En el eje vertical se representan las demandas de alimento (interrupciones/10 min) y en el eje horizontal se indica la hora del día (h). Las barras blancas y negras de la parte superior muestran el día y la noche, respectivamente. Las barras de error representan el error estándar de la media. (Modificado de del Pozo et al., 2011).

Esta preferencia por la alimentación nocturna en los peces cebra, contrasta gravemente con los protocolos de alimentación seguidos en todos los laboratorios dónde se producen, crían y mantienen estos animales. Así nosotros comparamos la calidad de las puestas y el crecimiento de peces cebra bajo nuestro sistema de alimentación a demanda con aquellos que siguen el horario estándar de alimentación. Para ello, me trasladé al **Instituto Tecnológico de Karlsruhe (KIT, Alemania)**, que comprende una de las instalaciones para la producción de pez cebra más grandes del mundo. Sorprendentemente, la alimentación a demanda no presentaba mejoría alguna en la producción de embriones, ni en número ni en la supervivencia (estos datos no han sido publicados). Sin embargo, en cuanto al crecimiento, medido como incremento de longitud y/o peso, los individuos sometidos a la demanda alargaron ligeramente su tamaño más que los que seguían unas horas de alimentación tradicionales.

En el KIT, no solo llevé el sistema de alimentación para peces cebra generado en mi tesis, sino que paralelamente, participé en el estudio de la influencia de diferentes colores de luz en la división celular, usando técnicas de inmunohistoquímica.

De vuelta en España me dispuse a estudiar ésta otra característica de la luz que afecta al comportamiento de los organismos, el espectro. En general, la aplicación de longitudes de onda corta (violeta, azul y verde) durante una hora en mitad de la noche, provocan modificaciones de comportamiento (distancia de natación, velocidad,

paralización, posición vertical y alteración del sueño) más severas que las longitudes de onda largas (naranja y roja), presentando además efectos más duraderos (Figura 7). Esto podría indicar que diferentes colores de luz podrían estar activando distintas vías en el cerebro, procesándose la información de forma diferente, aunque más estudios en esta línea tienen que ser llevados a cabo para confirmar esta hipótesis.

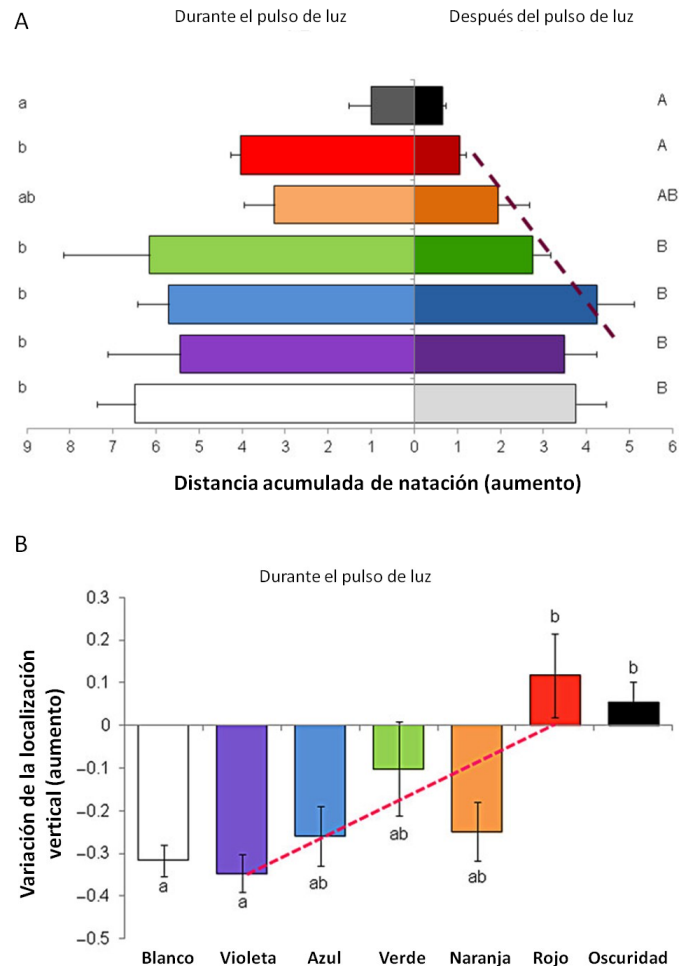


Figura 7. Incrementos de (A) la distancia acumulada de natación durante el pulso (panel izquierdo) y la hora siguiente al pulso de luz (panel derecho) para cada longitud de onda; y variación de la localización vertical en la columna de agua (B) durante el pulso de luz. (A) En el eje horizontal se muestra el incremento de actividad con respecto a la actividad base (antes de que se aplicara el pulso (normalizado como 1). (B) En el eje vertical se muestran las variaciones de la posición vertical con respecto a la localización inicial de los peces. Las barras de error representan el error estándar de la media. Las letras mayúsculas y minúsculas denotan las diferencias estadísticas de cada parámetro entre peces sometidos a las diferentes longitudes de onda dentro de cada fase, según el test de Kruskal–Wallis ($P < 0.01$) seguido por Mann–Whitney ($P < 0.008$). La línea discontinua representa la tendencia significativa (A) a incrementar la distancia acumulada de natación y (B) de mayores cambios en la posición vertical hacia la luz violeta, según el test de Jonckheere ($P < 0.01$). (Modificado de del Pozo et al., 2015).

Mi tesis concluyó con el reconocimiento de *cum laude*, muchas destrezas generales y una buena formación, pero sobre todo, fueron los 4 artículos publicados (uno más en camino) y un capítulo de libro, los que me abrieron las puertas a optar por un post-doc y continuar mi carrera científica.

ETAPA POSTDOCTORAL

Al acabar el doctorado, tuve la oportunidad de realizar un curso de verano sobre natación en peces en la **Universidad de Washington**, en la isla San Juan (Estados Unidos), gracias a una beca de dicha universidad. Esto me brindó una gran experiencia personal y laboral, la adquisición de nuevos conceptos y conocimientos, especialmente la respuesta de escape de los peces, en la que basé mi proyecto de investigación allí.

Una vez de vuelta en España, y guiada por mi mente analítica, surge una pregunta ¿seguir con la carrera investigadora a pesar de la inestabilidad y la falta de recursos? o ¿aplicar mis conocimientos en el sector privado? A pesar del mal momento en el que se encontraba (y aún se encuentra) la ciencia, la financiación y las oportunidades para los jóvenes investigadores en España, pensé que un post-doc me iba a aportar una experiencia sin parangón. Me empujaba el enfrentarme a un nuevo mundo, abrirme a otros campos de la ciencia, amplificar y diversificar mis conocimientos, acompañado de la supervivencia y el arrojo de quien se lanza solo a una nueva, y cada vez más diferente, aventura. Esta decisión me llevó a Israel, realizando un post-doc de 15 meses en la **Universidad de Tel Aviv**. Esta vez la financiación vino de la Sagol School de Neurociencia a la que está adscrito el laboratorio del Prof. Yoav Gothilf, mi supervisor. En el estudio también los ritmos biológicos del pez cebra pero en relación con procesos neuronales, así este post-doc me ofrecía la posibilidad de iniciarme en neurociencia, sin olvidar la cronobiología, descubriendo la forma en la que estudiar y entender las bases neuronales de procesos biológicos como son los ritmos de alimentación o de la sincronización de locomoción por los cambios de temperatura. El pez cebra ha sido seleccionado para estos estudios, dado su semejanza genética y molecular con los humanos y el amplio rango de herramientas genéticas que están actualmente disponibles en este modelo. Algunas de estas técnicas incluyen, la ablación o paralización dirigida a determinadas células, la incorporación de elementos fluorescentes que acompañan la expresión de un determinado gen, la generación de mutaciones que provocan la pérdida de expresión de un gen concreto, la activación/inactivación selectiva de determinadas neuronas mediante aplicación de luz azul o naranja, etc.

Si bien estas técnicas se podrían utilizar en otros organismos modelo, el pez cebra presenta otras ventajas que facilitan su empleo. Algunas de estas características proporcionan un ahorro de tiempo y espacio, como su tamaño reducido que permite mantener un mayor número de ejemplares; el alto número de embriones por puesta (pueden llegar a 200 embriones por pareja); su ciclo de vida corto (alcanza el estado de madurez sexual a los 3 meses aproximadamente); y la falta de estacionalidad en sus puestas en cautividad, lo que le permite una frecuencia de puesta semanal. Otras características como la transparencia de sus embriones que además, se desarrollan externamente, facilitan la selección de animales transgénicos portadores de proteínas fluorescentes, así como en la visualización *in vivo* de expresión de genes con marcadores fluorescentes y activación/inactivación de neuronas mediante luz. Debido a la inestabilidad de la carrera científica, la brevedad de algunos de los contratos de post-doc, la falta de recursos económicos para la investigación, que se ven aún más agravados en época de crisis, mi tiempo para completar el estudio fue insuficiente, dejándolo en manos de mis colegas de laboratorio la obtención de los prometedores resultados sobre la investigación que inicié allí.

Esa etapa me abrió las puertas a un campo nuevo y muy interesante para mí, la neurociencia, donde buscar explicaciones neuronales a aquellos comportamientos y procesos fisiológicos que estudié en el pasado, durante mi doctorado. Actualmente, me encuentro iniciando mi segundo post-doc en la **Universidad de Uppsala** (Suecia), bajo la supervisión y financiación del Dr. Henrik Boije. Nuestra línea de investigación emplea las más sofisticadas técnicas de ingeniería genética (esto es la manipulación controlada de determinados genes), microscopía y análisis de comportamiento, para entender los mecanismos neuronales que permiten la locomoción, pero los resultados aún están por llegar.

AGRADECIMIENTOS

Mi desarrollo profesional, y en parte, también personal, se lo debo a aquellos organismos que han financiado mi carrera científica, primeramente las instituciones españolas, y posteriormente las extranjeras. Gracias a todos los supervisores que he tenido a lo largo de los años, por abrirme las puertas de sus laboratorios, y a mis compañeros de trabajo que con compañerismo y trabajo en equipo han hecho toda investigación más fácil. Por último, gracias a Eubacteria por darme la oportunidad de compartir mi experiencia y trabajo científico con un público diferente.

REFERENCIAS

- Adron, J.W. (1972). Design for automatic and demand feeders for experimental fish. *J. Cons. Perm. Int. Explor. Mer.*, 34, 300–305.
- Alanara, A. (1996). The use of self-feeders in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) production. *Aquaculture*, 145, 1–20.
- Boluda Navarro, D., Rubio, V.C., Luz, R.K., Madrid, J.A. y Sánchez-Vázquez, F.J. (2009). Daily feeding rhythms of Senegalese sole under laboratory and farming conditions using self-feeding systems. *Aquaculture*, 291, 130–135.
- Boujard, T., Dugy, X., Genner, D., Gosset, C. y Grig, G. (1992). Description of a modular, low-cost, eater meter for the study of feeding-behavior and food preferences in fish. *Physiol. Behav.*, 52, 1101–1106.
- Del Pozo, A. y Sanchez-Vazquez, F.J. (2015). Light pulses at night elicit wavelength-dependent behavioral responses in zebrafish. *Journal of Zoology*, 297, 235–242.
- Del Pozo, A., Vera, L.M., Montoya, A. y Sanchez-Vazquez, F. J. (2013). Daily rhythms of blood glucose differ in diurnal and nocturnal European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) undergoing seasonal phase inversions. *Fish Physiology and Biochemistry*, 39, 695–699.
- Del Pozo, A., Vera, L.M., Sanchez, J.A. y Sanchez-Vazquez, F.J. (2012). Molecular cloning, tissue distribution and daily expression of *cry1* and *cry2* clock genes in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 16, 364–371.
- Del Pozo, A., Montoya, A., Vera, L.M. y Sánchez-Vázquez, F.J. (2012). Daily rhythms of clock gene expression, glycaemia and digestive physiology in diurnal/nocturnal European seabass. *Physiol. Behav.*, 106, 446–450.
- Del Pozo, A., Sanchez-Ferez, J.A. y Sanchez-Vazquez, F.J. (2011). Circadian rhythms of self-feeding and locomotor activity in zebrafish (*Danio rerio*). *Chronobiology International*, 28(1), 39–47.
- Hurd, M.W., Debruyne, J., Straume, M., Cahill, G.M. (1998). Circadian rhythms of locomotor activity in zebrafish. *Physiol. Behav.*, 65, 465–472.
- Goldman, B., Gwinner, E., Karsch, F.J., Saunders, D., Zucker, I. y Ball, G.F. (2004). Circadian rhythms and Photoperiodism. In *Chronobiology, Biological Timekeeping*. Dunlap JC, Loros JJ, de Coursey P (eds), pp.107–142. Sinauer Associates, Sunderland (Massachusetts, USA).
- López-Olmeda, J.F. y Sánchez-Vázquez, F.J. (2010). Feeding rhythms in fish: from behavioral to molecular approach. In E Kulczykowska (ed.). *Biological clock in fish*. Enfield, NH: Science Publishers, 155–184.
- Ohno, S. (1970). Duplication for the Sake of Producing More of the Same. In: *Evolution by gene duplication*. Heidelberg: Springer Berlin, 59–65.
- Panopoulou, G. y Poustka, A.J. (2005). Timing and mechanism of ancient vertebrate genome duplications - the adventure of a hypothesis. *Trends Genet.*, 21, 559–567.
- Sánchez-Vázquez, F.J. y Madrid, J.A. (2001). Feeding anticipatory activity in fish. In DF Houlihan, T Boujard, M Jobling (eds.). *Food intake in fish*. Oxford, UK: Blackwell Science, 216–232.
- Sánchez, J.A., Madrid, J.A. y Sánchez-Vázquez, F.J. (2010). Molecular cloning, tissue distribution, and daily rhythms of expression of *per1* gene in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Chronobiol. Int.*, 27 (1), 19–33.
- Sánchez-Vázquez, F.J., Martínez, M., Zamora, S. y Madrid, J.A. (1994). Design and performance of an accurate demand feeder for the study of feeding-behavior in sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Physiol. Behav.*, 56, 789–794.
- Takahashi, M., Murachi, S. y Moriwaki, S. (1981). A Feeding device for fishes designed for experimental use. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 47, 1131–1134.
- Villamizar, N., Herlin, M., López, M.D. y Sánchez-Vázquez, F.J. (2012). Daily spawning and locomotor activity rhythms of European sea bass broodstock (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 354–355, 117–120.
- Wang, H. (2008). Comparative analysis of period genes in teleost fish genomes. *J. Mol. Evol.*, 67, 29–40.
- Whitmore, D., Foulkes, N.S., Strahle, U. y Sassone-Corsi, P. (1998). Zebrafish Clock rhythmic expression reveals independent peripheral circadian oscillators. *Nat. Neurosci.*, 1 (8), 701–707.