



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS**  
**ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**EXPRESIÓN DE ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA ADQUISICIÓN DE LA  
FLOTABILIDAD DE HUEVOS Y EMBRIONES DE *SERIOLA LALANDI***

**Javiera Ignacia Rodríguez Limidoro**

Proyecto de Memoria para optar al  
Título de Médico Veterinario  
Departamento de Fomento de la  
Producción Animal

**PROFESOR GUÍA: JAIME ALFREDO PALOMINO MACKENNEY**

Departamento de Fomento de la  
Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias,  
Universidad de Chile

Proyecto FONDECYT 11140639

SANTIAGO, CHILE

2016



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS**  
**ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**EXPRESIÓN DE ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA ADQUISICIÓN DE LA  
FLOTABILIDAD DE HUEVOS Y EMBRIONES DE *SERIOLA LALANDI***

**Javiera Ignacia Rodríguez Limidoro**

Proyecto de Memoria para optar al  
Título de Médico Veterinario  
Departamento de Fomento de la  
Producción Animal

NOTA FINAL:.....

Firma

Profesor Guía: Jaime Palomino M. ....

Profesor Corrector: Víctor Martínez M. ....

Profesor Corrector: Pedro Smith S. ....

SANTIAGO, CHILE

2016

## **AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA**

Esta memoria va dedicada a mi pequeña familia, a mis padres Álvaro Rodríguez Vargas y Lorena Limidoro Kessler. Sin duda no ha sido fácil guiarme durante todos estos años, espero que mis actos y decisiones los llenen siempre de orgullo y dicha.

Agradezco al Doctor Jaime Palomino Mackenney por la oportunidad brindada y a todos los integrantes del Laboratorio de Reproducción, profesores y compañeros, por permitirme ser parte de tan buen grupo humano y profesional, haciendo de este tiempo una experiencia que sin duda atesoraré el resto de mi vida.

# ÍNDICE DE CAPÍTULOS

|   |            |
|---|------------|
| <b>ÍNDICE DE CAPÍTULOS</b>  | <b>i</b>   |
| <b>ÍNDICE DE TABLAS</b>   | <b>iii</b> |
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>  | <b>iii</b> |
| <b>RESUMEN</b>  | <b>iv</b>  |
| <b>SUMMARY</b>  | <b>v</b>   |
| <b>INTRODUCCIÓN</b>   | <b>1</b>   |
| <b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>                                       | <b>3</b>   |
| 1. Características de <i>Seriola lalandi</i>                        | 3          |
| 2. Ovogénesis y desarrollo folicular en peces teleósteos            | 4          |
| 3. Rol de las catepsinas durante la ovogénesis                      | 5          |
| 4. Rol de las catepsinas durante el desarrollo embrionario temprano | 5          |
| <b>HIPÓTESIS</b>  | <b>7</b>   |
| <b>OBJETIVO GENERAL</b>   | <b>7</b>   |
| <b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>  | <b>7</b>   |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>   | <b>8</b>   |
| 1. Obtención de muestras  | 8          |
| 2. Extracción de RNA y cuantificación del RNA total                 | 9          |
| 3. Transcripción reversa y cuantificación del cDNA                  | 9          |
| 4. Diseño de partidores   | 10         |
| 5. Concentración óptima de partidores                               | 11         |

|  |           |
|--|-----------|
| 6. Amplificación específica de los partidores  | 11        |
| 7. Eficiencia de amplificación de los genes de referencia y genes objetivos            | 12        |
| 8. PCR en tiempo real (qPCR)   | 12        |
| 9. Cuantificación relativa   | 14        |
| 10. Análisis estadístico   | 14        |
| <b>RESULTADOS</b>  | <b>16</b> |
| 1. Expresión relativa de catepsina B   | 16        |
| 2. Expresión relativa de catepsina D   | 17        |
| 3. Expresión relativa de catepsina L   | 18        |
| <b>DISCUSIÓN</b>   | <b>19</b> |
| <b>CONCLUSIÓN</b>  | <b>23</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b>  | <b>24</b> |
| <b>ANEXOS</b>  | <b>27</b> |
| Anexo 1: Porcentaje de flotabilidad total de huevos y embriones de <i>S. lalandi</i>   | 27        |
| Anexo 2: Diámetros de huevos y embriones de <i>S. lalandi</i> flotantes y no flotantes | 28        |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| Tabla 1: Función, secuencia y Tm de genes de referencia y genes objetivos _____      | 11 |
| Tabla 2: Concentración óptima de partidores y sus eficiencias de amplificación _____ | 12 |
| Tabla 3: Perfil térmico utilizado en los qPCR _____                                  | 13 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1: Expresión relativa de catepsina B en distintos estadios del desarrollo embrionario temprano de <i>S. lalandi</i> _____ | 16 |
| Figura 2: Expresión relativa de catepsina D en distintos estadios del desarrollo embrionario temprano de <i>S. lalandi</i> _____ | 17 |
| Figura 3: Expresión relativa de catepsina L en distintos estadios del desarrollo embrionario temprano de <i>S. lalandi</i> _____ | 18 |

## RESUMEN

En especies pelágicas como *S. lalandi*, se ha descrito que la flotabilidad en huevos y embriones es el reflejo de la viabilidad y calidad de estos. Esta característica, se adquiere con la proteólisis del vitelo provocando la hidratación y generando nutrientes para el desarrollo del embrión. Las enzimas involucradas en este proceso son las catepsinas, por lo que han sido propuestas como biomarcadores de calidad en estas especies. Con el objeto de conocer aspectos moleculares involucrados en la adquisición de la flotabilidad en *S. lalandi*, se evaluó la relación entre la expresión del mRNA que codifica para las catepsinas B, D y L y el nivel de flotabilidad de huevos y embriones tempranos de *S. lalandi* previamente categorizados como flotantes y no flotantes. Para esto, se colectaron muestras con distintos niveles de flotabilidad y en diferentes etapas del desarrollo. La expresión se evaluó en forma relativa mediante RT-qPCR utilizando partidores diseñados por alineamiento de secuencias de otros peces teleósteos. Los niveles de mRNA de catepsina B fueron mayores en los estadios de huevo, mórula y blástula, sin diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre estadios. En el estadio de gástrula la expresión de catepsina B disminuyó significativamente, sin presentar cambios en embriones de 24 horas. El mayor nivel de expresión de catepsina D se registró en los huevos no flotantes en comparación con los flotantes. En otros estadios la expresión de catepsina D no presentó diferencias relacionadas con la flotabilidad de los embriones. Catepsina L, por el contrario, tuvo mayores niveles de expresión en huevos flotantes, así como también en los estadios de gástrula y embriones de 24 horas con flotabilidad positiva. La expresión del mRNA de estas enzimas en diferentes etapas del desarrollo temprano de *S. lalandi* confirman su rol descrito en especies pelágicas, cumpliendo funciones específicas en la degradación de las proteínas del vitelo. Además, los perfiles de expresión observados en muestras flotantes y no flotantes permiten proponer a catepsina L como un marcador de buena calidad y a catepsina D como un marcador de mala calidad para los huevos de *S. lalandi*.

## ABSTRACT

In pelagic species such as *S. lalandi*, it has been described that the buoyancy in eggs and embryos reflect their viability and quality. This feature is acquired with the yolk proteolysis, which is responsible for the hydration process and generates nutrient for the embryos. The enzymes involved in this process are the cathepsins, which have been proposed as quality biomarkers in these species. In order to know molecular aspects involved in the acquisition of buoyance in *S. lalandi*, the expression of cathepsin B, D and L was assessed in eggs and early embryos previously classified as floating and non-floating samples. For this, floating and non-floating samples in different developmental stages were collected. Relative expression was evaluated by RT-qPCR using primers designed from sequence alignment of others teleost fish. Cathepsin B mRNA expression levels were higher in eggs, morula and blastocyst stage, with none-statistically significant differences ( $p > 0,05$ ) between these stages. In gastrula stage, the cathepsin B expression decreased significantly, without changes in 24 hours embryos. The highest expression level of cathepsin D was recorded in non-floating eggs, in comparison with those floating. In others stages, cathepsin D expression did not show differences related with the embryo buoyancy. On the contrary, cathepsin L had higher expression levels in floating eggs as well as in gastrula stage and 24 hours embryos with positive buoyancy. The enzymes mRNA expression during different early development stages in *S. lalandi* confirms their role described in pelagic species in the yolk protein degradation. In addition, the expression profiles observed in floating and non-floating samples allow proposing to cathepsin L as a good quality marker and cathepsin D as poor quality marker in *S. lalandi* eggs.

## INTRODUCCIÓN

La acuicultura en Chile es un área que ha experimentado un desarrollo marcado desde sus inicios en la década de los 80s, alcanzando una tasa promedio de crecimiento anual de un 10,5 % entre 1997 y 2004 (Norambuena y González, 2005). Sin embargo, esta actividad se encuentra centrada un 95 % en la producción de salmónidos, específicamente de salmón del atlántico (*Salmo salar*) y salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), abarcando su desarrollo principalmente en las regiones de Los Lagos y La Araucanía (Norambuena y González, 2005). El Programa de Diversificación de la Acuicultura Chilena (PDACH) impulsado por FONDEF de CONICYT, INNOVA CHILE de CORFO y la División de Innovación de la Subsecretaría de Economía, ha permitido que otras especies de interés comercial comiencen a tomar relevancia en la piscicultura, dejando de lado paulatinamente a la pesca por captura. Entre las especies escogidas prioritarias para diversificar la acuicultura nacional, se encuentra el pez *Seriola lalandi*, más conocido como palometa o dorado.

*Seriola lalandi* es un pez marino de distribución mundial, cuya actividad acuícola se desarrolla principalmente en Japón, Australia y Nueva Zelanda y es dependiente de la captura de juveniles del medio natural (Moran *et al.*, 2007). En Chile, forma parte de la pesca artesanal entre la Regiones de Antofagasta y Coquimbo, donde se encuentra como juvenil y adulto durante la temporada estival. Localmente es conocido como dorado o palometa, vidriola en la Isla Robinson Crusoe y toremo en la Isla de Pascua. Esta especie presenta cualidades distintivas que hacen atractivo el desarrollo de su cultivo, tales como una rápida tasa de crecimiento, buenos niveles de conversión alimenticia, resistencia a las altas densidades de cultivo, docilidad y características organolépticas que han determinado una creciente demanda en el mercado asiático y norteamericano (Poortenaar *et al.*, 2001). Sin embargo, el ciclo de producción completo en cautiverio ha sido difícil de lograr en esta especie, debido a una elevada mortalidad durante el periodo embrionario y larval (Moran *et al.*, 2007, Palomino *et al.*, 2014). Al tratarse de una especie emergente en la acuicultura, la información que se posee es escasa y no existe evidencia científica relacionada con desordenes durante la foliculogénesis y embriogénesis temprana que expliquen esta baja sobrevivencia.

En especies marinas pelágicas similares a *S. lalandi*, se ha atribuido esta baja sobrevivencia a la producción de huevos y embriones de baja calidad (Carnevali *et al.*, 2001), la cual se relacionaría directamente con el nivel de flotabilidad de estos huevos. La flotabilidad de los huevos y embriones de peces pelágicos, depende del grado de hidratación que experimentan los ovocitos en la etapa final de desarrollo folicular y maduración (Fabra *et al.*, 2006). Para que ocurra la hidratación, las proteínas del vitelo deben ser procesadas enzimáticamente con lo cual se crea un ambiente osmótico que permite el influjo de agua (Fabra *et al.*, 2006). Además, este procesamiento genera aminoácidos libres (AALs) los cuales son esenciales para la alimentación endógena en etapas tempranas del desarrollo embrionario. Por lo tanto, la proteólisis del vitelo es fundamental tanto para la hidratación del ovocito, al final de la maduración, como para la nutrición del embrión (Carnevali *et al.*, 2001).

Las principales enzimas implicadas en la proteólisis del vitelo en los peces teleósteos son las Catepsinas B, D y L (Carnevali *et al.*, 2006). **La expresión del gen que codifica estas enzimas**, así como su actividad durante las diferentes etapas de la maduración del ovocito y desarrollo embrionario temprano, es especie-específica, desconociéndose estos antecedentes en miembros del género *Seriola*. Es por ello que esta investigación tuvo como objetivo determinar la relación entre la expresión de estas enzimas, mediante la cuantificación relativa de su mRNA, y el grado de flotabilidad de huevos y embriones tempranos de *S. lalandi*.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1. Características de *Seriola lalandi*

*Seriola lalandi*, vernacularmente conocido como palometa o dorado, es una de las 47 especies pertenecientes al género *Seriola*, familia Carangidae, orden Perciformes, clase Actinopterygii. Es un pez de cuerpo fusiforme, comprimido lateralmente, el cual en estado adulto puede alcanzar una envergadura de 120 centímetros y pesos de hasta 100 kg. Posee una distribución circunglobal presente en el océano Atlántico, Índico y Pacífico, principalmente en aguas templadas alrededor de los 18 a 24° C; tanto pelágicas como demersales, con un rango de profundidad que fluctúa entre los tres a los 825 metros. Es posible hallarlos en pequeños cardúmenes o de forma solitaria. Se alimentan de otros peces de menor envergadura y crustáceos. La reproducción de forma natural se realiza en las costas de Japón, donde las larvas se desarrollan bajo las algas para posteriormente realizar una extensa migración (Moran *et al.*, 2007). El 50 por ciento de los machos y hembras alcanza la madurez con una longitud de 812 y 944 mm respectivamente (Poorternar *et al.*, 2001), desplegando una conducta de cortejo que consiste en una persecución a alta velocidad llevada a cabo por el macho (Moran *et al.*, 2007). La temporada de desove comprende los meses de primavera- verano cuando la temperatura del agua es superior a los 17° C (Moran *et al.*, 2007). Dentro de las variadas estrategias reproductivas, las hembras poseen un desarrollo ovárico sincrónico por grupos y son desovadoras parciales, lo que les permite realizar varias puestas durante la temporada reproductiva (Poorternar *et al.*, 2001). *S. lalandi* se caracteriza también por ser un pez pelágico, cuyos huevos son de densidad menor a la del agua de mar y desovados directamente en la columna de agua. Esto, sumado a la dispersión producto de las corrientes marinas, le permite a los huevos mantenerse a flote para lograr exitosamente la fecundación externa.

## 2. Ovogénesis y desarrollo folicular en peces teleósteos

La ovogénesis en los peces, es el proceso que transforma a las células germinales primordiales en ovocitos aptos para ser fecundados. Se puede dividir en dos etapas: crecimiento y maduración de los ovocitos (Nagahama y Yamashita, 2008). En los ovarios de vertebrados ovíparos, las células germinales primordiales después de la determinación sexual, se transforman en ovogonias y una vez iniciada la meiosis, las ovogonias se convierten en ovocitos que quedan detenidos en Profase de la primera división meiótica (Nagahama y Yamashita, 2008). El principal evento responsable del crecimiento del ovocito es la acumulación de las proteínas del vitelo (PVs) en su citoplasma, en un proceso que se denomina vitelogénesis (Devlin y Nagahama, 2002) y que consiste en la síntesis hepática de vitelogenina (VTG). El mecanismo molecular para la activación de la síntesis de las VTGs involucra un aumento de los niveles plasmáticos de la hormona folículo estimulante (FSH). La FSH estimula a las células de la granulosa y de la teca del ovocito para que aumenten la síntesis de estradiol, que a su vez induce la producción hepática y liberación de las VTGs al plasma sanguíneo (Carnevali *et al.*, 2006). Las VTGs se transportan por el torrente sanguíneo hasta el ovario, donde son endocitadas a través de vesículas mediadas por receptores específicos localizados en la membrana plasmática de los ovocitos en crecimiento (Hiramatsu *et al.*, 2002). Estas vesículas, se fusionan con los lisosomas en el citoplasma cortical y constituyen los cuerpos multivesiculares, los cuales se organizan en gránulos o glóbulos del vitelo (Carnevali *et al.*, 2006). La maduración final del ovocito involucra un drástico incremento del volumen inducido por un influjo de agua, en un proceso que se conoce como hidratación. Los principales efectores osmóticos de la hidratación son aminoácidos libres (AALs) derivados de la proteólisis de las PVs, de manera que al aumentar la concentración de estos, se favorece el ingreso de agua en los ovocitos maduros. Se ha descrito una correlación positiva entre el grado de proteólisis del vitelo y la hidratación del ovocito, donde la proteólisis de las PVs contribuye significativamente a crear la presión osmótica necesaria para producir el influjo de agua (Fabra *et al.*, 2006). Durante el procesamiento de los constituyentes del vitelo participan enzimas específicas llamadas catepsinas, cuya acción será determinante en la maduración final del ovocito, así como en el desarrollo embrionario temprano.

### **3. Rol de las catepsinas durante la ovogénesis**

Entre los diferentes tipos de estas enzimas, las que se han relacionado con la proteólisis del vitelo son; las cisteíno-proteasas catepsinas B y L y la aspártico-proteasa catepsina D (Carnevali *et al.*, 2006). Se ha estudiado la expresión y actividad enzimática de las catepsinas, durante la maduración ovocitaria en diferentes especies. Por ejemplo, en la dorada *Sparus aurata*, se señaló que la activación de las catepsinas es un proceso dependiente del tiempo y su actividad no siempre se correlaciona con el nivel de expresión de su respectivo ARN mensajero (mRNA) (Carnevali *et al.*, 2008). Específicamente, la catepsina D, responsable de un limitado primer clivaje de las VTGs, para producir las PVs (Carnevali *et al.*, 1999), presenta una mayor expresión durante la vitelogénesis temprana, pero una mayor actividad enzimática en la vitelogénesis media (Carnevali *et al.*, 2008; Kwon *et al.*, 2001). Esto, se atribuiría a la presencia de una pre-proenzima para la catepsina D (Carnevali *et al.*, 2006). Por el contrario en la catepsina B, sí se observó correlación entre actividad y expresión, con niveles máximos en la vitelogénesis temprana, decreciendo progresivamente hasta llegar a un mínimo en los huevos ovulados. Finalmente, se determinó que la catepsina L utiliza como sustrato específico lipovitelininas de cadena pesada y sus niveles de actividad progresan hasta un máximo durante la vitelogénesis tardía. Durante la vitelogénesis temprana, no se observó correlación entre el nivel de su mRNA y actividad enzimática, no obstante en etapas posteriores sí se correlacionó su expresión con la actividad (Carnevali *et al.*, 2008).

### **4. Rol de las catepsinas durante el desarrollo embrionario temprano**

El desarrollo embrionario en los peces teleósteos se lleva a cabo dentro de los huevos y los constituyentes del vitelo son la principal fuente de alimento para el embrión. De esta manera, los recursos acumulados en los ovocitos durante la ovogénesis son rápidamente degradados para producir AALs, ácidos grasos, entre otros, para ser utilizados por el embrión como fuente de energía y nutrientes. Por lo tanto, la degradación de las PVs acumuladas y almacenadas en los ovocitos, es esencial para el desarrollo embrionario temprano (Moran *et al.*, 2007).

Existe evidencia que las catepsinas no sólo se expresan y actúan durante la formación del ovocito en el ovario, sino que mantienen un rol fundamental durante el desarrollo embrionario temprano. En la lubina, *Dicentrarchus labrax*, la actividad de la catepsina B fue máxima durante el estadio de mórula; sin embargo, no hubo modificaciones del patrón electroforético del vitelo en esta etapa, por lo que se especula que esta proteasa no se relaciona con la proteólisis del vitelo sino con la activación inicial de las catepsinas D y L, las que incrementaron su actividad significativamente durante la blastulación (Carnevali *et al.*, 2001). Igualmente, la actividad máxima de las catepsinas A y L se observó durante la segmentación y estuvo asociada a cambios en el patrón electroforético del vitelo. Por lo tanto, estas enzimas estarían relacionadas directamente con la degradación del vitelo. Por su parte, la catepsina D tuvo su mayor actividad durante el proceso de eclosión de la larva, en paralelo con otros cambios del patrón electroforético del vitelo (Carnevali *et al.*, 2001). Por otro lado, en la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*, especie demersal, la expresión de las catepsinas D y L presentó niveles decrecientes durante el desarrollo embrionario temprano, siendo tres a cuatro veces mayor en huevos recién desovados y embriones de dos horas post fecundación, en comparación a estadios más avanzados de la embriogénesis. Catepsina B, en cambio, prácticamente solo se expresó en la ovogénesis, presentando niveles muy bajos de sus transcritos durante el desarrollo embrionario temprano (Kwon *et al.*, 2001).

La expresión y actividad de las catepsinas indicarían que estas enzimas presentan un rol fundamental para la sobrevivencia de huevos y embriones de especies pelágicas, participando en el proceso de hidratación y adquisición de la flotabilidad, así como en la generación de nutrientes para el desarrollo del embrión. Además, este rol se presentaría en forma temporal y especie-específico durante la maduración ovocitaria y embriogénesis, participando en diferentes etapas de la degradación de los componentes del vitelo. Por lo tanto y con el fin de conocer aspectos moleculares involucrados en el proceso de adquisición de la flotabilidad en huevos y embriones de *S. lalandi*, en este trabajo se evaluaron los niveles de mRNA de las catepsinas B, D y L, comparando su expresión entre muestras flotantes y no flotantes de este pez pelágico.

## **HIPÓTESIS**

El mRNA de las catepsinas B, D y L se expresará en los distintos estadios del desarrollo temprano de *S. lalandi*, presentándose de forma diferencial entre huevos y embriones flotantes y no flotantes.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la relación entre la expresión del mRNA que codifica para las catepsinas B, D y L y el nivel de flotabilidad de huevos y embriones tempranos de *S. lalandi*, previamente agrupados en las categorías flotantes y no flotantes.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Cuantificar la expresión relativa de los mRNAs que codifican para las catepsinas B, D y L, en huevos y embriones tempranos de *S. lalandi*, flotantes y no flotantes.
2. Comparar la expresión del mRNA de estas enzimas en huevos y embriones tempranos de *S. lalandi* previamente categorizados como flotantes y no flotantes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Obtención de muestras

Todos los animales utilizados en el presente estudio, al igual que durante el procedimiento experimental, fueron tratados acorde a las normas del CONICYT. Las muestras de ovocitos y embriones fueron suministradas por Acuino S.A, empresa comercial que se dedica a la producción en cautiverio de *S. lalandi*, en la ciudad de Caldera, región de Atacama de Chile, como parte del PDACH. Acuino S.A cuenta con un stock de 100 reproductores, machos y hembras en una proporción 1:1, mantenidos en cuatro tanques de 20.000 litros cada uno, con sistema de recirculación con agua de mar a 23° C, salinidad de 35 ppm, O<sub>2</sub> al 100 % y un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, lo que permite obtener desoves durante los 12 meses del año. Se realizaron tres recolecciones de muestras en los meses de marzo y mayo del 2015 y enero del 2016, con la finalidad de obtener tres replicas biológicas a partir de un pool de huevos desovados. En cada replica biológica se colectaron alrededor de 20 a 50 muestras de cada uno de los estadios, los que corresponden a huevo (H), mórula (M), blástula (B), gástrula (G) y embriones de 24 horas (E24), según lo descrito por Moran *et al.*, (2007). Las muestras fueron trasladadas desde el estanque a un frasco colector de forma cónica con una capacidad de 4 Lts., el cual se dispuso de manera invertida. Una vez en el colector las muestras permanecieron por 10 minutos, tiempo que permitió evidenciar diferencias en los niveles de flotabilidad. Las muestras flotantes fueron extraídas desde la superficie, mientras que los huevos y embriones con menor nivel de flotabilidad fueron obtenidos de la extracción de un volumen de aproximadamente 2 Lts. de agua desde el fondo del frasco colector mediante una llave. Las muestras fueron mantenidas en RNAlater® Solution (Ambion®) para su transporte a 4°C y posterior procesamiento. Con la finalidad de llevar un control interno de la calidad de las muestras flotantes y no flotantes utilizadas en esta investigación y asegurar así el uso de aquellas que cumplieran con los criterios de homogeneidad morfológica y de tamaño, es que en cada proceso de colección se extrajo una sub-muestra correspondiente a un volumen de 100 ml de agua. Después de cinco minutos en el frasco colector se contabilizó el número de huevos o embriones presentes en ese volumen, lo que permitió estimar el porcentaje de flotabilidad

total de cada uno de los estadíos (Anexo 1). Al mismo tiempo se evaluó la morfología y diámetro (Anexo 2) de aproximadamente entre 10 a 20 de estas muestras mediante un ocular milimetrado.

## **2. Extracción de RNA y cuantificación del RNA total**

El RNA fue extraído a través del método de columna de afinidad con el Kit de Purificación GeneJET™ RNA (Thermo) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para preservar la integridad del RNA se trabajó en una campana de flujo laminar y en condiciones libres de RNasas. La concentración de RNA total fue cuantificada mediante fluorimetría utilizando el aparato Qubit® Fluorometer (Invitrogen™) y el Kit de cuantificación Qubit® RNA Assay (Molecular Probes® Invitrogen™). Posteriormente las muestras fueron almacenadas a -80° C hasta su uso.

## **3. Transcripción reversa y cuantificación del cDNA**

Las muestras fueron procesadas para transcripción reversa (RT) usando el conjugado enzimático SuperScript™ IV First- Strand Synthesis System (Invitrogen™) siguiendo las instrucciones del fabricante. El conjugado enzimático incluye un tratamiento inicial con DNasa I, endonucleasa que hidroliza los enlaces fosfodiéster del DNA de hebra doble o simple, eliminando así el DNA genómico contaminante. La concentración del DNA complementario (cDNA) fue determinada utilizando el Kit de cuantificación Qubit® ssDNA Assay (Molecular Probes® Invitrogen™). Una vez obtenido el cDNA fue almacenado a -20° C para su posterior uso en los protocolos de qPCR.

#### 4. Diseño de partidores

Los partidores utilizados para los genes objetivo, Catepsinas B, D y L, se obtuvieron a partir de estudios previos, donde se procedió a su diseño mediante el alineamiento de secuencias disponibles en GenBank de diversos peces teleósteos del orden Perciforme, al cual pertenece *S. lalandi*. Para catepsina B, se utilizaron las secuencias de las siguientes especies: *Epinephelus coioides* (N° acceso de la secuencia: EU714151.1), *Oreochromis niloticus* (N° acceso de la secuencia: XM\_003454521.1), *Oplegnatus fasciatus* (N° acceso de la secuencia: HM060314.1), *Lutjanus argentimaculatus* (N° acceso de la secuencia: FJ772423.1) y *S. aurata* (N° acceso de la secuencia: DQ875330.1); para catepsina D: *Miichthys miiuy* (N° acceso de la secuencia: HM628578.1), *O. fasciatus* (N° acceso de la secuencia: AB597935.1), *Lates calcarifer* (N° acceso de la secuencia: EU143237.1) y *Chionodraco hamatus* (N° acceso de la secuencia: AJ007878.1); y para catepsina L: *E. coioides* (N° acceso de la secuencia: JN113582.1), *O. fasciatus* (N° acceso de la secuencia: GQ903767.1), *S. aurata* (N° acceso de la secuencia: DQ875329.1) y *L. calcarifer* (N° acceso de la secuencia: EU143238.1). Para esto, se utilizó el Programa ClustalX en el cual se escogieron las regiones más conservadas, de manera de obtener amplicones entre 100 a 200 pb. Además, los partidores fueron testeados con el Programa NetPrimer, cuyos criterios de selección son las temperaturas de fusión ( $T_m$ , del inglés *melting temperature*) cercanas a 60° C, con diferencia entre los partidores *Forward* y *Reverse* no superior a 5° C, porcentajes de guanina y citosina entre 30 y 60 %, longitudes de partidores de 18 a 20 pb y libres de dímeros, horquillas y la mayoría sin repeticiones de bases. Por otro lado, los genes de referencia utilizados en este trabajo fueron  $\beta$ -actina (ACTB, N° acceso de la secuencia: AB179839.1) y la proteína asociada a microtúbulo (MAP1B, N° acceso de la secuencia: AB461862.1). Estos genes, fueron seleccionados en base a su estabilidad en el desarrollo embrionario de *S. lalandi*, mediante el algoritmo Normfinder entre un panel de seis genes constitutivos (Herrera, 2013). Todos los partidores utilizados en este trabajo son presentados en la Tabla 1.

Tabla 1: Función, secuencias y Tm de genes de referencia y genes objetivos.

| Nombre del Gen                                 | Función   | Secuencia <i>Forward</i> (F) 5'-3'<br>Secuencia <i>Reverse</i> (R) 5'-3' | Tm*                  |
|--|---|--|----------------------|
| <b><math>\beta</math>-actina (ACTB)</b>        | Componente del citoesqueleto y mediador de la motilidad celular | F: AGGGAAATCGTGCGTGACAT<br>R: GCTGAAGTTGTTGGGCGTTT                       | F:57.0°C<br>R:56.7°C |
| <b>Proteína asociada a microtúbulo (MAP1B)</b> | Proteína estructural del citoesqueleto                          | F: TCATCAAGATTATCAGGAGGCG<br>R: GGAAGCATACACCATGTAGAGG                   | F:54.3°C<br>R:55.0°C |
| <b>Catepsina B</b>                             | Proteólisis del vitelo  | F: GTAATGGTGGCTACCCTTCA<br>R: CATACTGAATCTGCTCCTCG                       | F:54.3°C<br>R:52.5°C |
| <b>Catepsina D</b>                             | Proteólisis del vitelo  | F: GCCAAGTCCAGCACATACG<br>R: ACAGAGATGCGTGGGTAGG                         | F:56.3°C<br>R:56.5°C |
| <b>Catepsina L</b>                             | Proteólisis del vitelo  | F: ACTACAACCTGCGCAACGAC<br>R: AACTGGAAAGACTCGTGACC                       | F:54.8°C<br>R:54.6°C |

\*Tm, corresponde al promedio de las Tm del *Forward* y *Reverse*.

## 5. Concentración óptima de los partidores

Para cada juego de partidores, *reverse* y *forward*, se utilizaron las concentraciones descritas por Herrera (2013) (Tabla 2), las que fueron establecidas a partir de una matriz de concentración de partidores. Para lo cual se realizaron RT-qPCR, utilizando diversas combinaciones de cada juego con una concentración estable de cDNA de muestras de ovario. Finalmente, las concentraciones fueron seleccionadas bajo los criterios de menor valor Ct y menor desviación estándar entre las repeticiones intraensayo, según las recomendaciones de la guía MIQE (Bustin *et al.*, 2009).

## 6. Amplificación específica de los partidores

Con la finalidad de regular el efecto de las amplificaciones inespecíficas de la Polimerasa, con la consecuente unión química del fluoróforo (SYBR Green) y detección de una mayor fluorescencia generando resultados no confiables, es que se evaluó la curva de fusión de los partidores (Tm). La Tm, del inglés *melting temperature*, representa la cinética de disociación del producto amplificado. Esto permitió la selección y empleo de juegos de partidores con amplificación específica de la polimerasa, es decir, la ausencia de dímeros y

otros artefactos, determinados mediante un peak único y claro, lo que fue complementado mediante la comprobación de ausencia de amplificación en blancos sin templado.

## 7. Eficiencia de amplificación de los genes de referencia y genes objetivo

Es de relevancia para la cuantificación relativa de un gen determinar la eficiencia de amplificación (E). La E corresponde a la capacidad de la reacción de qPCR de doblar el número de copias de las cadenas de cDNA en cada ciclo de amplificación. Estas se estimaron mediante la pendiente de la curva estándar (Eficiencia =  $10^{(-1/\text{pendiente})}$ ) de cada juego de partidores. En la Tabla 2. se observan las eficiencias obtenidas por Herrera (2013), donde el valor 2 representa un 100% de eficiencia según la fórmula:  $(10^{-1/\text{pendiente}} - 1) \times 100$  (Wong y Medrano, 2005), siendo todos, excepto catepsina L cercanos a 2. Este último gen, a pesar de tener eficiencia lejana al porcentaje ideal, presentó amplificaciones específicas y coeficiente de correlación, en las curvas estándar, sobre 0,9.

Tabla 2: Concentración óptima de los partidores y sus eficiencias de amplificación.

| Nombre del Gen     | Concentración partidores | Eficiencia de amplificación |
|--------------------|--------------------------|-----------------------------|
| <b>ACTB</b>        | F: 0,2μM; R: 0,2μM       | 2,04                        |
| <b>MAP1B</b>       | F: 0,6μM; R: 0,6μM       | 1,88                        |
| <b>Catepsina B</b> | F: 0,4μM; R: 0,6μM       | 1,87                        |
| <b>Catepsina D</b> | F: 0,6μM; R: 0,4μM       | 2,19                        |
| <b>Catepsina L</b> | F: 0,4μM; R: 0,6μM       | 1,47                        |

## 8. PCR en tiempo real (qPCR)

Previo al análisis de expresión, se estandarizaron y optimizaron las condiciones de qPCR para todos los juegos de partidores, según lo indicado en la guía MIQE (Bustin *et al.*, 2009), evaluando las matrices de concentración de los partidores y las curvas estándar de cada uno de ellos, utilizando como templado el cDNA obtenido de muestras de ovario. La expresión de los genes de referencia y de los genes que codifican las diferentes catepsinas fueron estudiados mediante qPCR. Las amplificaciones fueron realizadas con el termociclador Illumina® Eco Real Time PCR System Model EC-100-1001, usando el Kit

Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2X) (Thermo). Se formularon soluciones de reacción de 12.5  $\mu$ l que contenía: 6.25  $\mu$ l de Máxima SYBR Green/Fluoresceína qPCR Master Mix (2X), un volumen de 0.2- 0.6  $\mu$ M de cada partidor, un volumen con 20 ng de cDNA y el volumen diferencial fue completado con agua DEPC hasta alcanzar los 12.5  $\mu$ l. Las soluciones fueron cargadas en un *plate* de 48 posillos y puestas en el termociclador, donde se realizó la cuantificación según las condiciones de temperatura y número de ciclos descritas por el fabricante, detalladas en la Tabla 3. Cada qPCR consideró la evaluación de un gen objetivo, catepsina B, D o L, junto a ambos genes de referencia ACTB y MAP1B. En cada experimento se incluyeron controles negativos sin cDNA templado y sin partidor con la finalidad de evaluar la contaminación de los reactivos o la presencia de dímeros. Para la evaluación de cada gen objetivo, tanto en las muestras flotantes como no flotantes, se realizaron 6 réplicas técnicas que además fueron evaluadas en duplicado.

Tabla 3: Perfil **térmico** utilizado en los qPCR.

| Fase                 | Temperatura °C   | Tiempo      | Número de ciclos |
|----------------------|------------------|-------------|------------------|
| UDG Pre-tratamiento  | 50               | 2 minutos   | 1                |
| Denaturación inicial | 95               | 10 minutos  | 1                |
| Denaturación         | 95               | 15 segundos | 40               |
| Alineación           | Tm de partidores | 30 segundos |                  |
| Extensión            | 72°C             | 30 segundos | 1                |
|                      | 95°C             | 15 segundos |                  |
| Curva de fusión*     | Tm de partidores | 15 segundos | 1                |
|                      | 95°C             | 15 segundos |                  |

\*Curva de fusión o de *melting*, por lo general la realiza el equipo PCR en tiempo real al finalizar el protocolo de amplificación y representa la cinética de disociación del producto amplificado. Un único *peak* se relacionan con una amplificación específica, es decir, ausencia de dímeros u otros artefactos en los productos amplificados.

## 9. Cuantificación relativa

La expresión del mRNA de las catepsinas B, D y L fue evaluado de forma relativa en relación a la expresión de los genes de referencia ACTB y MAP1B. Para ello en cada experimento, los niveles de expresión génica fueron registrados como valores Ct, que corresponden al número del ciclo del qPCR donde la señal de fluorescencia emitida por el fluoróforo excitado puede ser detectada por sobre el valor umbral. Tanto para los genes objetivos como los genes de referencia se utilizó el promedio de los valores Ct de la muestra en duplicado. De esta manera el valor Ct que representa un evento de desove (replica biológica) de cada muestra y de cada gen evaluado correspondió al valor promedio de las réplicas técnicas. Éstos valores Ct se transformaron en valores relativos denominados *Quantity* (Q) a través del Método  $\Delta$ Ct según la fórmula definida por Vandesompele., (2002).

$$Q = E^{-\Delta Ct} = E^{-(\text{menor Ct} - \text{Ct de la muestra})}$$

Posteriormente se procedió a calcular el Factor de normalización (FN). FN corresponde a la media geométrica de los Qs de los genes de referencia, ACTB y MAP1B, de los diferentes estadios, tanto de las categorías flotantes como no flotantes. El valor de expresión relativa normalizada en cada muestra para cada replica biológica fue obtenida a partir del cociente entre el valor del Q del gen objetivo analizado y el FN.

## 10. Análisis estadístico

Se evaluaron tres réplicas biológicas, correspondientes a tres eventos de desove independientes. De cada desove se obtuvo un pool de 20 a 50 individuos para cada uno de los 5 estadios del desarrollo temprano antes mencionados, tanto flotantes como no flotantes. Además, se realizaron al menos seis réplicas técnicas para cada uno de los genes objetivos, las cuales a su vez fueron evaluadas en duplicado. En cada qPCR se incorporaron muestras controles sin templado y sin partidor. La expresión relativa ya normalizada fue expresada como el promedio +/- la desviación estándar, los datos fueron sometidos a un ANOVA con

el Programa Profesional InfoStat, versión 2004; Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Esto puede ser expresado mediante el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ij} = \mu + F_i + D_j + (FD)_{ij} + \epsilon_{ij}$$

$Y_{ij}$  = Expresión relativa de las catepsinas

$\mu$  = Media poblacional

$F_i$  = Desarrollo Embrionario (1: H, 2: M, 3: B, 4: G y 5: E24)

$D_j$  = Flotabilidad (1: Flotantes y 2: No flotantes)

$(FD)_{ij}$  = Interacción entre Desarrollo embrionario y la Flotabilidad

$\epsilon_{ij}$  = Error

Diferencias significativas entre promedios se evaluaron usando el Test de Duncan y los valores fueron considerados estadísticamente significativos cuando  $P < 0,05$

## RESULTADOS

### 1. Expresión relativa de catepsina B

Los mRNAs que codifican para catepsina B, se expresaron en todos los estadios de desarrollo evaluados en este trabajo, así como en las muestras flotantes y no flotantes (Figura 1). Sin embargo, no se registraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en los niveles de expresión de esta enzima entre estas dos categorías. Los mayores niveles de expresión de catepsina B se observaron en los estadios de huevo, mórula y blástula, no presentando diferencias significativas entre estos estadios ( $p > 0,05$ ). Una disminución en la expresión de catepsina B, fue posible observar en el estadio de gástrula, lo cual se mantuvo sin cambios significativos ( $p > 0,05$ ) en embriones de 24 horas.

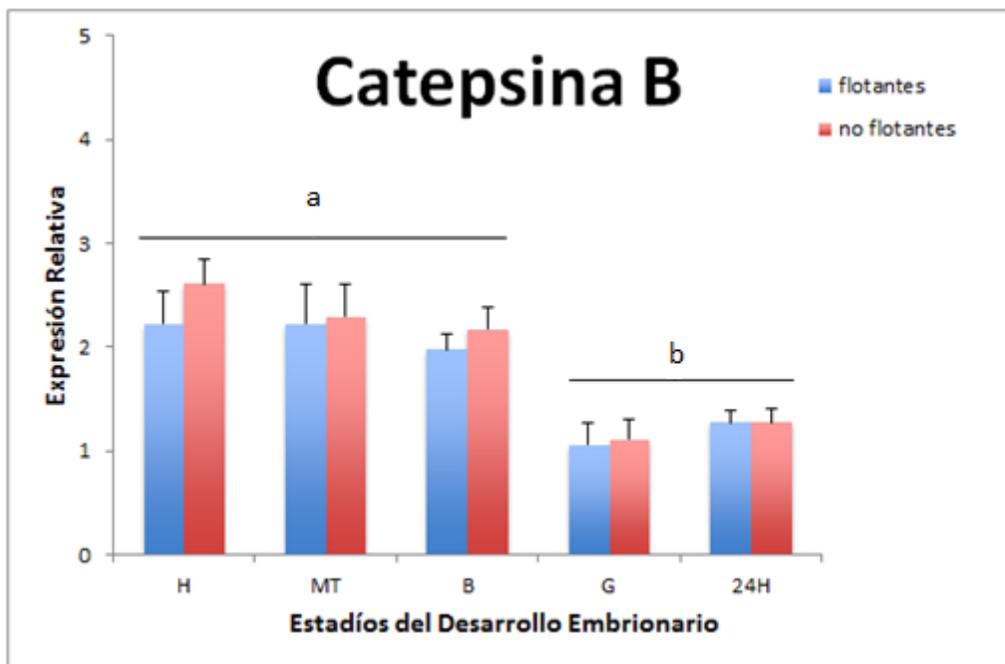


Figura 1: Expresión relativa de catepsina B en distintos estadios del desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi*

## 2. Expresión relativa de catepsina D

Los mRNAs que codifican para Catepsina D, también se expresaron en todos los estadios del desarrollo evaluados en este trabajo, tanto en las muestras flotantes como no flotantes. En cada una de estas categorías se presentaron niveles variables de este mRNA. En las muestras flotantes, los mayores niveles de expresión se presentaron en mórulas y blástulas, las cuales solo difirieron del nivel de expresión obtenido en embriones de 24 horas, en donde se observó la menor expresión de esta enzima. En las muestras no flotantes, se observó una continua disminución de este transcrito a través del desarrollo. Sin embargo, las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) se observaron entre los dos estadios más tempranos (huevos y mórulas) y embriones de 24 horas. Solamente, los altos niveles de expresión de catepsina D en huevos no flotantes presentaron una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) en comparación a los niveles registrados en los huevos flotantes (Figura 2).

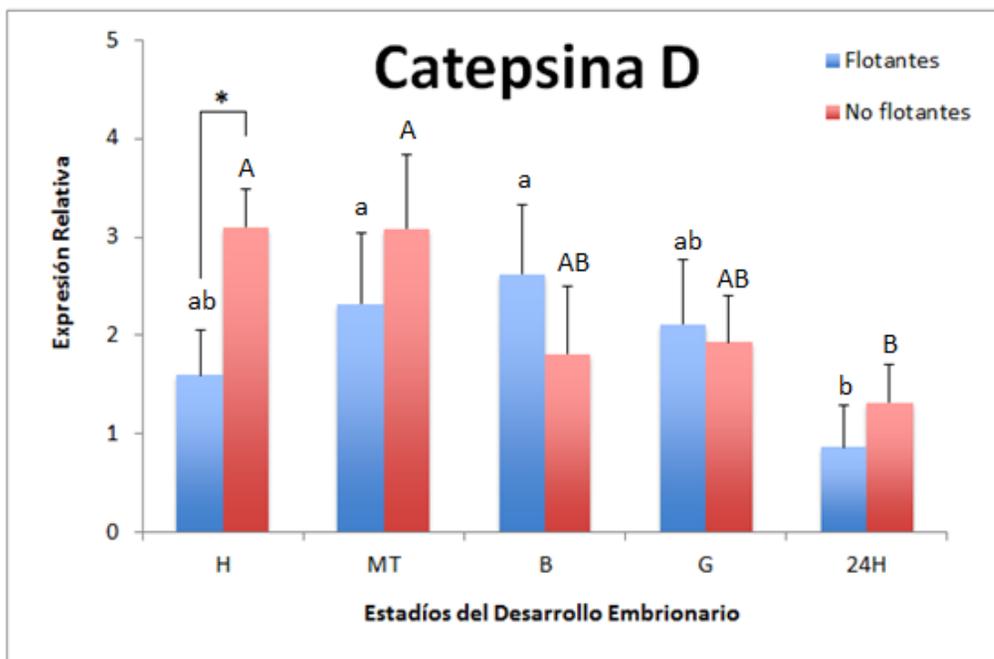


Figura 2: Expresión relativa de catepsina D en distintos estadios del desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi*.

### 3. Expresión relativa de catepsina L

Los mRNAs codificantes de catepsina L, también se expresaron en todos los estadios evaluados en este estudio, tanto en las muestras flotantes como no flotantes (Figura 3). Se registraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los niveles de expresión de catepsina L en huevos flotantes y no flotantes, siendo los huevos flotantes los que poseían el mayor nivel de expresión de esta enzima. Se presentaron bajos niveles de expresión de catepsina L en muestras no flotantes en todos los estadios evaluados. En las muestras flotantes en cambio, se observó una disminución de los niveles de catepsina L en el estadio de mórula, para comenzar a ascender nuevamente en blástula, sin diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre estadios. Se registraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en los niveles de expresión de los estadios de gástrula y embriones de 24 horas, en donde además se observó una mayor la expresión de la enzima en las muestras flotantes.

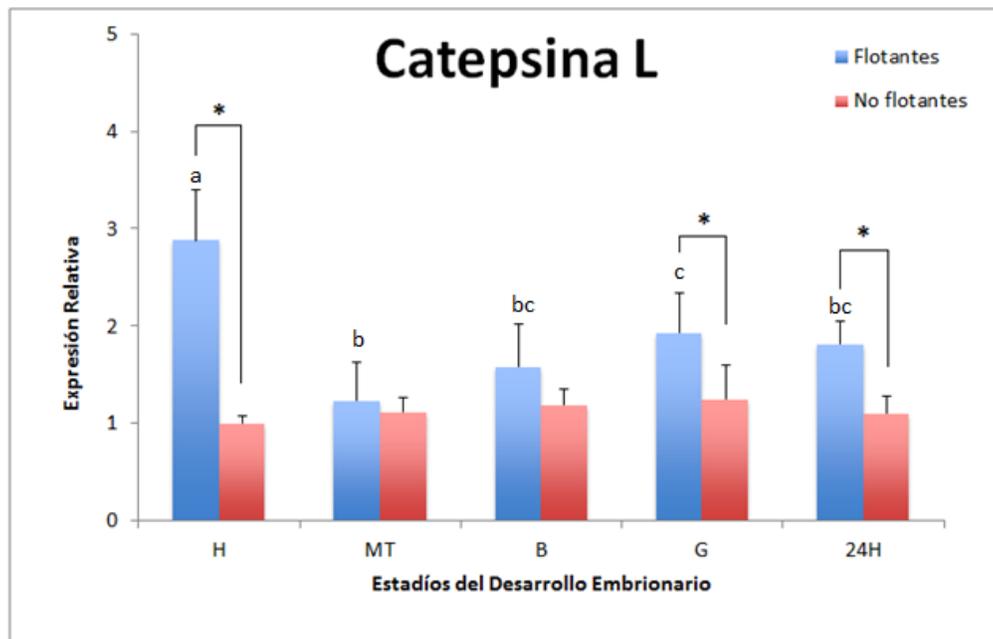


Figura 3: Expresión relativa de catepsina L en distintos estadios del desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi*

## DISCUSIÓN

La búsqueda de nuevas especies que permitan la diversificación de la actividad acuícola en Chile ha posicionado a *S. lalandi* como objeto de investigación científica. Al tratarse de una especie emergente, la información que se posee sobre los aspectos concernientes a su reproducción son escasos, dejando una serie de incógnitas que repercuten en la puesta en marcha de un sistema productivo eficiente y rentable. Mediante este estudio se ha podido determinar los niveles de expresión de los mRNAs que codifican para las principales enzimas involucradas en el procesamiento del vitelo y por lo tanto en la adquisición de la flotabilidad de los huevos y embriones de *S. lalandi*.

Los patrones de expresión obtenidos en este trabajo han permitido relacionar la estrategia reproductiva de *S. lalandi*, con antecedentes descritos en otros peces marinos pelágicos, tales como la lubina (*Dicentrarchus labrax*) y la dorada (*Sparus aurata*). En el caso particular de la lubina, al igual que en *S. lalandi*, se hallaron altos niveles de expresión de las catepsinas B, D y L en huevos y embriones, no así de las catepsinas A, C y E. (Carnevali *et al.*, 2001). De esta forma es posible señalar que estas tres enzimas, catepsinas B, D y L se expresan en el desarrollo temprano de *S. lalandi*, al igual que en otros peces desovadores pelágicos.

La ausencia de una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) en los niveles de expresión del mRNA que codifica para catepsina B, en los distintos estadios del desarrollo flotantes y no flotantes de *S. lalandi*, se condice con los estudios de actividad enzimática realizados en huevos y embriones de *D. labrax*, donde tampoco se registran diferencias significativas entre muestras con una flotabilidad positiva y negativa (Carnevali *et al.*, 2001). A pesar de no haber diferencias significativas en relación a la flotabilidad en las muestras analizadas en este trabajo, sí fue posible distinguir un mayor nivel de expresión de catepsina B en estadios más tempranos del desarrollo, como es el caso de huevos, mórulas y blástulas. Una posible explicación de esto, se sustentaría en el rol de esta enzima en la proteólisis del vitelo, en donde se ha sugerido que actuaría como un activador de la aspártico-proteasa catepsina D (Carnevali *et al.*, 2001). En el estudio desarrollado en *D.*

*labrax*, se reportaron máximos niveles de actividad de catepsina B en estadios iniciales del desarrollo embrionario, pero sin modificación del patrón electroforético de las proteínas del vitelo, lo que sugiere que catepsina B no posee una relación directa en la adquisición de la flotabilidad en estas especies pelágicas, sino más bien que cumpliría un rol como activador de la catepsina D en su estado de zimógeno.

Los altos niveles de expresión del mRNA que codifica para catepsina D registrados en huevos no flotantes de *S. lalandi*, concuerdan con los niveles de actividad enzimática reportados para catepsina D en huevos no flotantes de lubina (Carnevali *et al.*, 2001). En diversos tipos celulares, se ha demostrado que esta aspártico proteasa estaría relacionada con procesos apoptóticos. Su alto nivel de expresión y actividad en huevos no flotantes puede deberse a su rol en el proceso de muerte celular programada en estos huevos (Carnevali *et al.*, 2003). Estudios realizados en *S. aurata* permitieron determinar en huevos no flotantes, además de una alta actividad enzimática de catepsina D, la presencia de moléculas directamente relacionadas en procesos apoptóticos. Asimismo, se estableció que los huevos no flotantes de dorada poseían un menor diámetro en comparación a los huevos flotantes, presentaban tumefacción de la mitocondria a la microscopía electrónica de transmisión, fragmentación del DNA por electroforesis y expresión de FAS receptor detectado mediante western blot (Carnevali *et al.*, 2003). En relación al rol de catepsina D en la proteólisis del vitelo, se le adjudica a esta aspártico-proteasa la función de una hidrólisis inicial de la vitelogenina endocitada para la generación de fosfovítina, lipovítelina y  $\beta$ -componentes, los que actúan como los primeros vectores osmóticos requeridos para la hidratación del huevo (Carnevali *et al.*, 1999; Lubzens *et al.*, 2010). A diferencia de la actividad enzimática que caracteriza a los lisosomas, donde las proteínas son rápidamente transformadas a aminoácidos libres, la proteólisis de la vitelogenina se desarrolla dentro de los gránulos de vitelo de forma controlada (Carnevali *et al.*, 2001). La actividad enzimática en estos compartimentos celulares, es fuertemente regulada por diferentes mecanismos, en los cuales participan inhibidores, activadores y enzimas en estado de zimógeno. De esta manera, se ha planteado que la relación entre catepsina B y catepsina D permite que la degradación del contenido del vitelo sea progresiva y se realice en estados específicos del desarrollo embrionario, generando una producción constante de vectores osmóticos, así como de un suministro permanente y estable de AALs que permitan dar soporte y nutrición

al embrión a lo largo de todo el desarrollo hasta su eclosión como larva. Considerando los aspectos mencionados, la elevada expresión del mRNA codificante de catepsina D en huevos no flotantes de *S. lalandi*, así como la elevada actividad de esta enzima reportada en huevos no flotantes de lubina (Carnevali, *et al.*, 2001) podrían ser indicativos de una falla en los mecanismos que regulan la proteólisis del vitelo, lo que tendría como consecuencia una degradación prematura de la vitelogenina, afectando negativamente tanto la mantención de la flotabilidad, así como la producción de AALs y por consiguiente la viabilidad de esos huevos.

Los altos niveles de expresión del mRNA codificante de catepsina L en huevos flotantes de *S. lalandi*, es compatible con los altos niveles de actividad enzimática registrados en huevos flotantes de lubina (Carnevali *et al.*, 2001). La disminución en la expresión de catepsina L en el estadio de mórula, con un consecuente nuevo aumento en blástulas hasta alcanzar niveles estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ) en gástrulas y embriones de 24 horas flotantes, puede ser explicado mediante el rol que desempeña catepsina L en la proteólisis de los residuos de vitelogenina, específicamente sobre una lipovitelina de alto peso molecular, lo que permite la formación de ALLs que actuarían en el gradiente osmótico y generación de nutrientes para el desarrollo embrionario. (Carnevali *et al.*, 1999). En este sentido, se ha propuesto que las principales funciones de las catepsinas durante la ovogénesis y desarrollo embrionario son la proteólisis del vitelo y la subsecuente producción de aminoácidos libres (Carnevali *et al.*, 2001; Carnevali *et al.*, 2006). En *S. lalandi*, se ha determinado que el principal recurso de energía metabólica del cual depende el desarrollo embrionario temprano, son los aminoácidos libres (Moran *et al.*, 2007). Estos disminuyen durante la embriogénesis hasta la eclosión de la larva, lo cual no se refleja en un aumento del contenido proteico de los embriones, pero sí en un aumento de la concentración de amonio. Por lo tanto, los aminoácidos libres no son utilizados en procesos anabólicos, sino como recurso energético (Moran *et al.*, 2007). Por lo tanto, la disminución de los aminoácidos libres a través del desarrollo y los altos niveles de expresión de mRNA de catepsina L en huevos y embriones flotantes más avanzados, coincide con el rol propuesto para esta enzima en la proteólisis del vitelo en especies pelágicas.

Tal como se ha planteado con anterioridad, la elevada mortalidad en las etapas tempranas del desarrollo embrionario y larval, conocidas como el periodo de *hatchery*, constituye uno de los mayores inconvenientes para el cultivo intensivo de *S. lalandi* y unas de las mayores incógnitas en relación a la actividad reproductiva de esta especie. Actualmente la selección de los huevos que son destinados a cultivo se realiza de manera subjetiva, mediante la observación de los niveles de flotabilidad. No obstante, se ha evidenciado que los huevos tienden a precipitar paulatinamente al fondo del estanque a medida que progresa el desarrollo embrionario (Anexo 1). Es por ello que la eficiencia del cultivo en la etapa de *hatchery* requiere de herramientas cualitativas y cuantitativas generadas a partir del conocimiento científico (Herrera, 2013). Mediante esta investigación, fue posible determinar los patrones de expresión de las principales enzimas lisosomales involucradas en la adquisición de la flotabilidad de huevos y embriones tempranos de *S. lalandi*, característica que también ha sido fuertemente asociada con la viabilidad de huevos y embriones en otros peces pelágicos.

La posibilidad de utilizar los niveles de expresión génica, particularmente la expresión significativa ( $p < 0,05$ ) de catepsina D en huevos no flotantes y la de catepsina L en huevos flotantes de *S. lalandi*, como biomarcadores de calidad, permitiría seleccionar de forma temprana y certera los huevos más aptos para ser cultivados. Los biomarcadores de calidad, corresponden clásicamente a características morfológicas o la detección molecular de enzimas, receptores o productos específicos de células y tejidos, cuya presencia está fuertemente asociada a la competencia de los mismos. Los marcadores de calidad son frecuentemente utilizados para predecir la viabilidad ovocitaria y embrionaria, con la finalidad de asegurar el éxito en los procesos de reproducción asistida. Bajo este contexto los niveles de expresión de catepsina D actuarían como un marcador de mala calidad, mientras que los niveles de catepsina L como un marcador de buena calidad en huevos de *S. lalandi*, tal como se ha propuesto para los huevos de otras especies pelágicas como la lubina y la dorada (Carnevali *et al.*, 2001).

## CONCLUSIÓN

Las catepsinas son enzimas fundamentales para la sobrevivencia de las especies pelágicas. Éstas cumplen un rol esencial en la proteólisis del vitelo, permitiendo la generación de productos de menor peso molecular, los que actúan en la formación del gradiente osmótico que le confiere la flotabilidad a los huevos, así como en la producción de AALs que constituirían la principal fuente energética para el desarrollo embrionario y larval. La confirmación de la expresión de los mRNAs que codifican para las catepsinas B, D y L en los distintos estadios del desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi*, sumado a la expresión diferencial evidenciada entre las categorías flotantes y no flotantes, constituye uno de los primeros acercamientos a las incógnitas reproductivas de esta especie emergente, la que se asemeja considerablemente a sus símiles pelágicos. La utilización de estos niveles de expresión como biomarcadores de calidad, puede permitirnos seleccionar aquellos desoves potencialmente más aptos para ser cultivados y de esta manera reemplazar la selección basada en la observación de los niveles iniciales de flotabilidad, en la cual hemos observado una disminución a medida que progresa el desarrollo embrionario. De esta manera y considerando los resultados obtenidos en este estudio, proponemos la técnica de RT-qPCR como una herramienta relativamente sencilla y rápida para conocer los niveles de expresión relativa de las catepsinas, particularmente la expresión de catepsina D (marcador de mala calidad) y catepsina L (marcador de buena calidad) y de ésta forma en un periodo acotado de tiempo estimar la viabilidad de los desoves, clasificando así los huevos en aptos y no aptos para ser cultivados.

## BIBLIOGRAFÍA

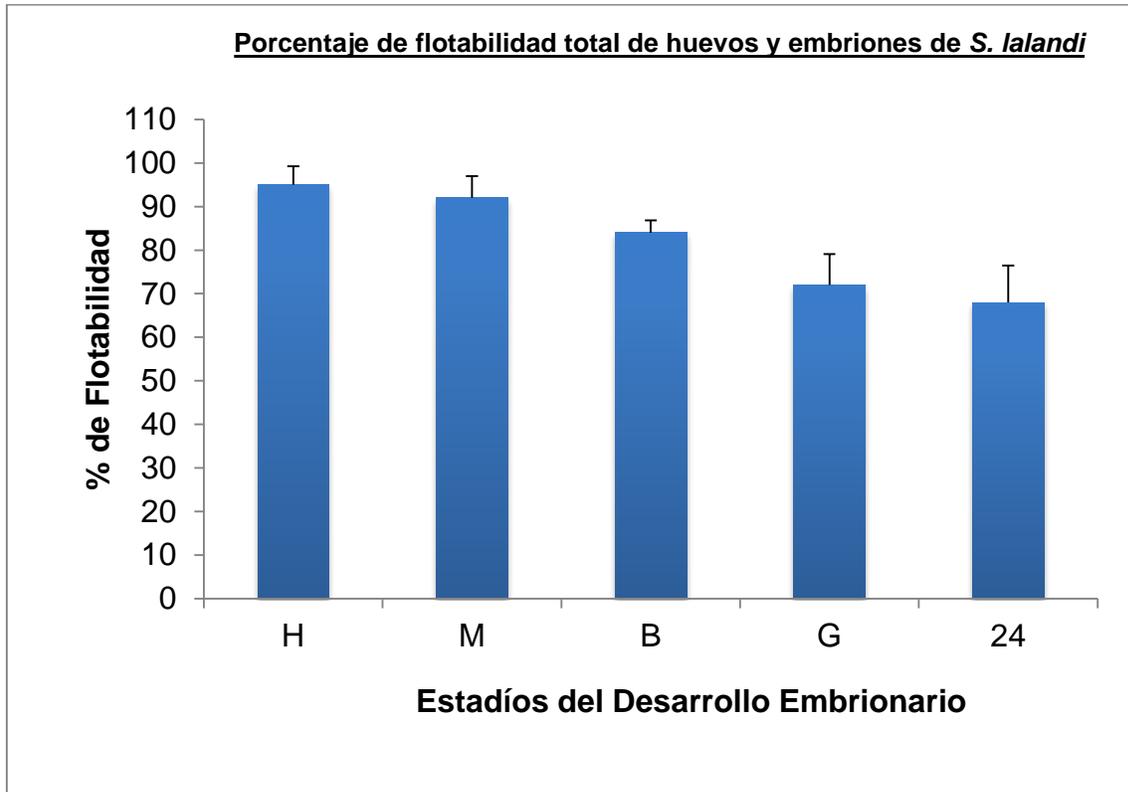
- **BUSTIN, S.; BENES, V.; GARSON, J.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.; SHIPLEY, G.; VANDESOMPELE, J.; WITTWER, C.** 2009. The MIQUE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*. 55: 611- 622.
- **CARNEVALI, O.; CARLETTA, R.; CAMBI, A.; VITA, A.; BROMAGE, N.** 1999. Yolk formation and degradation during oocyte maturation in seabream *Sparus aurata*: Involvement of two lysosomal proteinases. *Biology of Reproduction*. 60:140-146.
- **CARNEVALI, O.; CIONNA, C.; TOSTI, L.; CERDA, J.; GIOACCHINI, G.** 2008. Changes in cathepsin gene expression and relative enzymatic activity during gilthead sea bream oogenesis. *Molecular Reproduction and Development*. 75:97-104
- **CARNEVALI, O.; CIONNA, C.; TOSTI, L.; LUBZENS, E.; MARADONNA, F.** 2006. Role of cathepsins in ovarian follicle growth and maturation. *General and Comparative Endocrinology*. 146:195-203
- **CARNEVALL, O.; MOSCONI, G.; CAMBI, A.; RIDOLFI, S.; ZANUY, S.; POLZONETTI-MAGNI, A.** 2001. Changes of lysosomal enzyme activities in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) eggs and developing embryos. *Aquaculture*. 239: 445- 465.
- **DEVLIN, R.; NAGAHAMA, Y.** 2002. Sex determination and differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*. 208: 191- 364.
- **FABRA, M.; RALDÚA, D.; BOZZO, M.; DEEN, P.; LUBZENS, E.; CERDA, J.** 2006. Yolk proteolysis and aquaporin-1 play essential roles to regulate fish oocyte hydration during meiosis resumption. *Developmental Biology*. 295: 250- 262.

- **HERRERA, G.** 2013. Expresión de catepsinas durante el desarrollo embrionario temprano en el pez dorado (*Seriola lalandi* Valenciennes 1833). Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Medicina Veterinaria. 45p.
  
- **HIRAMATSU, N.; ICHIKAWA, N.; FUKADA, H.; FUJITA, T.; SULLIVAN, C.; HARA, A.** 2002. Identification and characterization of proteases involved in specific proteolysis of vitellogenin and yolk proteins in salmonids. *Journal of Experimental Zoology*. 292: 11-25.
  
- **KWON, J.; PRAT, F.; RANDALL, C.; TYLER, C.** 2001. Molecular characterization of putative yolk processing enzymes and their expression during oogenesis and embryogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biology of Reproduction*. 65:1701-1709.
  
- **LUBZENS, E.; YOUNG, G.; BOBE, J.; CERDA, J.** 2010. Oogenesis in teleost: How fish eggs are formed. *General and Comparative Endocrinology*. 165: 367- 389.
  
- **MORAN, D.; SMITH, C.; GARA, B.; POORTERNAAR, C.** 2007, Reproductive behavior and early development in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi* Valenciennes 1833.) *Aquaculture*. 262:95-104
  
- **NAGAHAMA, Y.; YAMASHITA, M.** 2008. Regulation of oocyte maturation in fish. *Development, Growth & Differentiation*. 50: 195- 219.
  
- **NORAMBUENA, R.; GONZÁLEZ, L.** 2005. Visión general del sector acuícola nacional – Chile. National Aquaculture Sector Overview Fact Sheets [En línea]. <[http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso\\_chile/es](http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_chile/es)> [Consulta: 31-07-2015].
  
- **PALOMINO, J.; HERRERA, G.; DETTLEF, F.; MARTÍNEZ, V.** 2014. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 expression in previtellogenic oocytes and during early embryonic development of Yellow-tail Kingfish *Seriola lalandi*. *Biological Research*. 47:60
  
- **PFAFFL, M.** 2004. Quantification strategies in real-time PCR. *AZ of quantitative PCR*. 3: 87- 112.

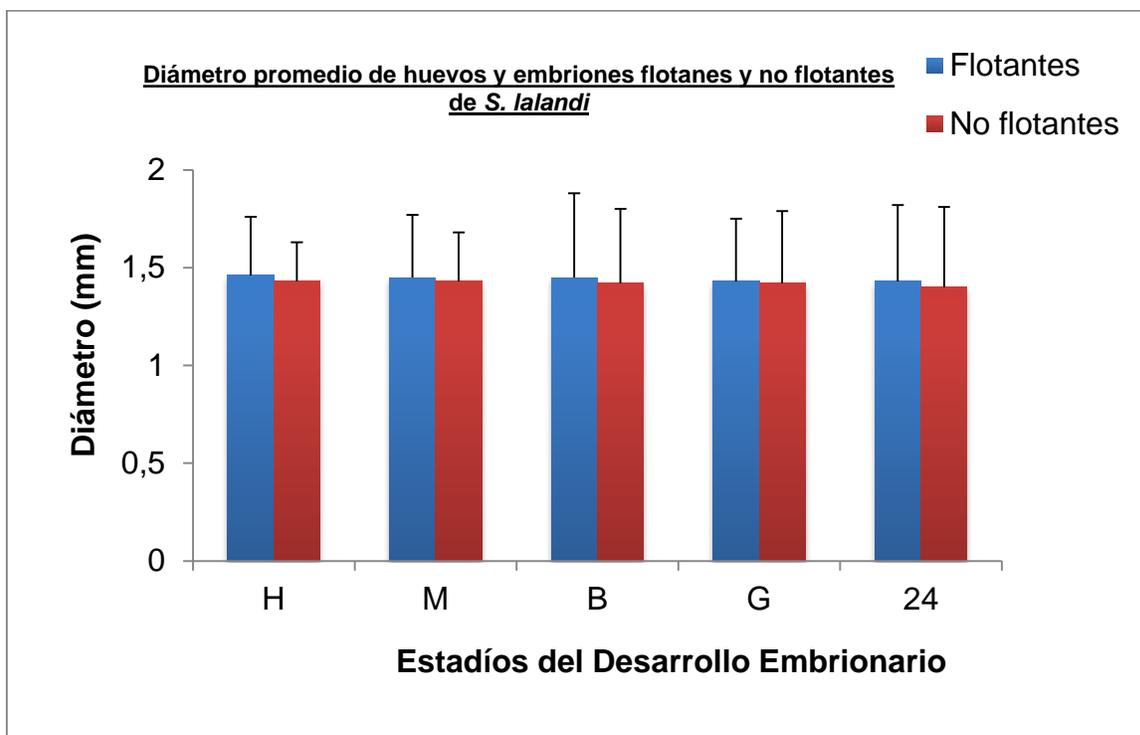
- **POORTERNAR, C.; HOOKER, S.; SHARP, N.** 2001. Assessment of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi lalandi*) reproductive physiology, as a basic for aquaculture development. *Aquaculture*. 201:271-286
  
- **VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F.** 2002. Accurate normalization real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3:RESEARCH0034.
  
- **WONG, M.; MEDRANO, J.** 2005. Review. Real-time for mRNA quantification. *Biotechniques*. 39: 75-85

**ANEXO**

Anexo 1: Porcentaje de flotabilidad total de huevos y embriones de *S. lalandi*.



\* Porcentaje de flotabilidad total de huevos y embriones de *S. lalandi*: huevos (H) un 95%, mórulas (M) un 92%, blástulas (B) un 84%, gástrulas (G) un 72%, y (E24) un 68%. Se observa un descenso progresivo en los niveles de flotabilidad a medida que avanza el desarrollo embrionario.

Anexo 2: Diámetro promedio de huevos y embriones flotantes y no flotantes de *S. lalandi*

\* Diámetro de huevos y embriones flotantes y no flotantes de *S. lalandi*: (H) flotantes 1,46 mm, (H) no flotantes 1,43 mm, (M) flotantes 1,45 mm, (M) no flotantes 1,43 mm, (B) flotantes 1,45 mm, (B) no flotantes 1,42 mm, (G) flotantes 1,43 mm, (G) no flotantes 1,42 mm, (E24) flotantes 1,43 mm, (E24) no flotantes 1,40 mm.