



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

**EXPRESIÓN DE CATEPSINAS DURANTE EL DESARROLLO  
EMBRIONARIO TEMPRANO EN EL PEZ DORADO**  
*(Seriola lalandi Valenciennes 1833)*

GIANNINA ANDREA HERRERA PIZARRO  
Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Fomento de la Producción Animal

PROFESOR GUÍA: DR. JAIME PALOMINO MACKENNEY  
PROYECTO FONDECYT POSTDOCTORADO 3120211 Y PDACH ÁREA GENÉTICA  
SANTIAGO, CHILE

2013



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

**EXPRESIÓN DE CATEPSINAS DURANTE EL DESARROLLO  
EMBRIONARIO TEMPRANO EN EL PEZ DORADO**  
*(Seriola lalandi Valenciennes 1833)*

GIANNINA ANDREA HERRERA PIZARRO

Memoria para optar al Título

Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Fomento de la Producción Animal

NOTA	.....	
		NOTA FIRMA
PROFESOR GUÍA: DR. JAIME PALOMINO MACKENNEY	.....	.....
PROFESOR CORRECTOR: DR. VÍCTOR MARTÍNEZ	.....	.....
PROFESOR CORRECTOR: DR. EDUARDO KESSI	.....	.....

SANTIAGO, CHILE

2013

## **AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA**

A mis padres, Sonia y Mario, en agradecimiento por el cariño, la educación y los valores; a mis hermanas, Carolina y Catalina, por la compañía, el apoyo y ser siempre mi ejemplo de vida y a mis abuelos por el cariño y el aprecio. Además, durante este proceso de educación universitaria, me acompañaron amigos y compañeros, a los que quisiera agradecerles por la compañía y el apoyo incondicional.

Por otro lado, en la realización de este trabajo, quisiera agradecer principalmente al Doctor Jaime Palomino, por su paciencia al instruirme en la investigación y en el mundo profesional y al Doctor Víctor Martínez junto a todos los participantes del Laboratorio Inbiogen de FAVET, por recibirme y aconsejarme siempre en los momentos necesarios.

Al concluir esta etapa de mi vida, donde este escrito no sólo busca un título sino que cierra un ciclo, espero, que a la vez, sea sólo un primer paso para continuar con mis objetivos profesionales.

# 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 EJECUTIVO</b>	<b>iv</b>
<b>EXECUTIVE SUMMARY</b>	<b>v</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>3</b>
1.    Ovogénesis y desarrollo ovocitario en peces teleósteos	3
1.1 Crecimiento de los ovocitos	3
1.2 Maduración final del ovocito	4
2.    Rol de las catepsinas durante la ovogénesis	4
3.    Rol de las catepsinas durante el desarrollo embrionario temprano.	5
4.    Expresión génica	6
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>9</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>9</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>10</b>
1.    Recolección de huevos y embriones	10
2.    Expresión de catepsinas B, D y L durante el desarrollo embrionario temprano	10
2.1 Extracción y purificación de RNA total	11
2.2 Transcripción Reversa (TR)	11
2.3 Diseño de partidores	12
2.4 PCR en tiempo real o qPCR	13
2.4.1 Matriz de partidores	14
2.4.2 Eficiencia de la PCR	14
2.4.3 Expresión durante el desarrollo embrionario temprano	15
2.5 Cuantificación relativa	15
3.    Análisis estadístico	17
<b>RESULTADOS</b>	<b>18</b>
1.    Calidad del RNA total	18
2.    Partidores	18

3. Amplificación específica de partidores _____	19
4. Concentración óptima de los partidores _____	20
5. Eficiencia de amplificación de los genes de referencia y objetivos _____	20
6. Análisis de los genes de referencia en el desarrollo embrionario temprano de <i>S. lalandi</i> _____	21
7. Expresión de las catepsinas en el desarrollo embrionario temprano de <i>S. lalandi</i> _____	24
<b>DISCUSIÓN</b> _____	<b>26</b>
1. Análisis de estabilidad de los genes de referencia _____	26
2. Expresión normalizada de las catepsinas B, D y L en distintos estadios del desarrollo embrionario temprano de <i>S. lalandi</i> _____	29
<b>CONCLUSIÓN</b> _____	<b>33</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> _____	<b>35</b>
<b>ANEXOS</b> _____	<b>39</b>
Anexo 1: Componentes y cantidades por reacción del kit Maxima SYBR Gree/Fluorescein qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific). _____	39
Anexo 2: Perfil término usado en los qPCR. _____	39
Anexo 3: Curvas de Fusión de los genes de referencia y de los genes objetivos (catepsinas). _____	39
Anexo 4: Curvas estándar de los genes de referencia y de los genes objetivos (catepsinas). _____	43

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Función, secuencias y Tm de los genes de referencia y objetivos (catepsinas). _____	19
Tabla 2: Concentración óptima de los partidores y sus eficiencias de amplificación. _____	20
Tabla 3: Valores de variación intragrupal de los genes de referencia en distintos estadíos del desarrollo embrionario temprano de <i>S. lalandi</i> . _____	22
Tabla 4: Valores de estabilidad de los genes de referencia. _____	24

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Electroforesis del RNA total de las muestras de estadíos del desarrollo embrionario temprano de <i>S. lalandi</i> . _____	18
Figura 2: Variación Intergrupala de los genes de referencia en estadíos del desarrollo embrionario temprano de <i>S. lalandi</i> . _____	23
Figura 3: Expresión Normalizada promedio para catepsina B, D y L en distintos estadíos del desarrollo embrionario temprano de <i>S. lalandi</i> . _____	25
Figura 4: Líneas de tendencia de expresión de las catepsinas B, D y L en los estadíos del desarrollo embrionario temprano de <i>S. lalandi</i> . _____	25

## RESUMEN EJECUTIVO

El pez dorado *S. lalandi*, es una especie marina pelágica, que posee características favorables para su producción intensiva, tales como altas tasas de crecimiento y de conversión alimenticia, resistencia a las altas densidades de los cultivos, docilidad y demanda internacional creciente (Poortenaar *et al.*, 2001). Sin embargo, en su acuicultura se ha observado una baja sobrevivencia en las etapas de *hatchery*, la que se atribuiría principalmente a la producción de huevos y embriones de baja calidad (Carnevali *et al.*, 2001). Una de las principales causas de esta deficiencia, sería una deficiente acumulación y procesamiento del vitelo durante la ovogénesis y el desarrollo embrionario temprano. Se ha visto, que las catepsinas B, D y L son las principales enzimas lisosomales involucradas en la proteólisis del vitelo en los vertebrados ovíparos (Carnevali *et al.*, 2006). La expresión de estas enzimas, así como su actividad durante la ovogénesis y la embriogénesis, parecen ser especie-específicas, desconociéndose estos antecedentes en miembros del género *Seriola*. En este trabajo, se evaluó la expresión de las catepsinas B, D y L durante diferentes etapas del desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi* (E1: huevos recién fecundados, E2: 4 células, E3: 16 células, E4: bástula, E5: 24 HPF y E6: 48 HPF). Se utilizó la técnica RT-qPCR y como estrategia de cuantificación, la normalización de la expresión con los genes constitutivos Tubulina (TUB) y  $\beta$ -actina (ACTB), los cuales se validaron como referencia entre seis genes constitutivos candidatos. Las tres catepsinas se expresaron durante los distintos estadios, presentando un nivel de expresión alto en los primeros estadios, representando probablemente los niveles de transcritos maternos. Luego, durante la blastulación donde ocurre la MBT, hubo una disminución brusca de la expresión. Posteriormente, la expresión presentó una disminución en catepsina B, no así para catepsina D y L, que aumentaron sus niveles de expresión indicando la expresión cigótica de estas enzimas. Estos resultados concuerdan con la función de estas proteasas en generar las condiciones osmóticas necesarias para la hidratación final del ovocito y además, proveer al embrión de energía durante su periodo de alimentación endógena, a través de los aminoácidos libres generados de la proteólisis del vitelo.

## EXECUTIVE SUMMARY

The goldfish *S. lalandi* is a marine pelagic species that spawn buoyant eggs and presents positive characteristics to be intensively produced, such as high growth and food conversion rates, resistance to high culture densities, docility and an increasing international demand (Poortenaar *et al.*, 2001). However, its aquiculture shows low survival in hatchery stages, which is mainly attributed to the poor quality in eggs and embryos production (Carnevali *et al.*, 2001). One of the principal causes of this deficiency would be the poor yolk's accumulation and processing during the oogenesis and early embryonic development. It has shown cathepsins B, D and L are the major lysosomal enzymes involved in oviparous vertebrate yolk proteolysis (Carnevali *et al.*, 2006). The expression of these enzymes, as well as their activity during the oogenesis and the embryogenesis appear to be species-specific and these antecedents are unknown in members of *Seriola* genus. In this work, we assessed the expression of cathepsins B, D and L at different stages during *S. lalandi* early embryo development (E1: newly fertilized eggs; E2: four cell; E3: 16 cell; E4: blastula; E5: 24 HPF; E6: 48 HPF). It was chosen the RT-qPCR technique and as quantification strategy, the normalization of the expression with the constitutive genes Tubulin (TUB) and  $\beta$ - actin (ACTB), which were validated as reference genes between six constitutive candidate genes. The three cathepsins were expressed during different development stages, showing a high expression level in the early stages, probably representing maternal transcript levels. Then, during the blastula when de MBT occurs, there was a decrease of their expression. Subsequently, the expression showed a decrease in cathepsin B but not cathepsin D and L, indicating the expression zygotically of these enzymes. These results are consistent with the function of these proteases to generate the necessary osmotic conditions for the final hydration of the oocyte, and also, provide energy to the embryo during its endogenous feeding through the free amino acids produced by yolk's proteolysis.

## INTRODUCCIÓN

La acuicultura, uno de los sistemas de producción alimentaria de crecimiento más rápido representando casi el 50% de los productos pesqueros mundiales destinados a la alimentación (FAO, 2013). En la producción acuícola mundial, Chile ocupa el octavo lugar, ubicándose como el principal país productor de América. La acuicultura nacional se concentra en un número reducido de especies, siendo el 96% del total nacional representado sólo por cuatro especies: choritos (30%), salmón del Atlántico (27%), trucha arco iris (23%) y salmón coho (16%). Además, otro aspecto que caracteriza la producción acuícola nacional es la centralización de la actividad en donde el 97% se ubica entre la Región de los Lagos y la Región de Magallanes (Sernapesca, 2012). Bajo este escenario, el Consejo Nacional de Innovación para la Competitividad (CNIC) señaló a la acuicultura como uno de los sectores claves para el desarrollo del país y estableció la necesidad de diversificar la acuicultura chilena. De este modo, el CNIC encomendó a CORFO y a CONICYT el diseño e implementación del Programa de Diversificación Acuícola (PDACH), con el fin de contribuir al desarrollo de nuevas industrias basadas en nuevos cultivos y comercialización de especies marinas de alto potencial exportador. Este programa, priorizó la investigación en cuatro especies de peces marinos con potencial productivo y exportador, entre ellas, el pez dorado *Seriola lalandi* (CONICYT, 2010).

*Seriola lalandi*, es una especie marina 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.*, 2007a). Es un pez migratorio, que llega al norte de Chile como juvenil y adulto, especialmente entre la Región de Antofagasta y la Región de Coquimbo, donde se localiza su mayor actividad pesquera de tipo artesanal. Localmente es conocido como dorado o palometa, vidriola en la Isla Robinson Crusoe y toremo en la Isla de Pascua. Entre las características que hacen atractiva su producción intensiva, se menciona: tasas de crecimiento elevadas, altos niveles de conversión alimenticia, resistencia a las altas densidades de los cultivos, docilidad y una demanda internacional creciente (Poortenaar *et al.*, 2001). Sin embargo, la producción en cautiverio del ciclo de vida completo de esta especie se ha visto limitada por una baja sobrevivencia

en las etapas de *hatchery*, que sería atribuida a la producción de huevos y embriones de baja calidad (Carnevali *et al.*, 2001).

Una de las principales causas de la baja calidad de huevos y embriones se atribuye a problemas ocasionados durante el crecimiento y la maduración del ovocito, con la consecuente ovulación de ovocitos no madurados completamente, con baja acumulación y procesamiento de las proteínas del vitelo en su citoplasma. La proteólisis del vitelo es fundamental tanto para la hidratación del ovocito, al final de la maduración, así como para la nutrición del embrión en desarrollo (Carnevali *et al.*, 2001). Para que ocurra la hidratación del ovocito, las proteínas que constituyen el vitelo, son procesadas para crear un ambiente osmótico adecuado que permite el influjo de agua, confiriéndole la flotabilidad positiva, que es característica en huevos de especies pelágicas, como *S. lalandi* (Fabra *et al.*, 2006). Los huevos de especies pelágicas se mantienen en la columna de agua producto del proceso proteolítico que sufre el vitelo que continúa posteriormente durante el desarrollo embrionario temprano, para generar la principal fuente de energía que necesita el embrión durante este periodo (Moran *et al.*, 2007b).

El procesamiento o proteólisis de las proteínas del vitelo en los ovocitos de los peces teleósteos está dado por un conjunto de enzimas lisosomales, entre las cuales destacan las catepsinas. La evidencia bibliográfica indica que las catepsinas B, D y L son las principales enzimas involucradas en la proteólisis del vitelo en vertebrados ovíparos (Carnevali *et al.*, 2006). La expresión de estas enzimas, así como su actividad durante las diferentes etapas de la maduración del ovocito y desarrollo embrionario temprano, parecen ser especie-específicas, desconociéndose estos antecedentes en miembros del género *Seriola*.

La eficiencia del cultivo en etapas de *hatchery* en peces marinos requiere de herramientas cualitativas y cuantitativas generadas a partir del conocimiento científico. Por lo tanto, estas enzimas, esenciales en la formación de un embrión viable, podrían representar biomarcadores de calidad en huevos y embriones producidos en cautiverio. De esta manera y con el fin de generar conocimiento de los fundamentos biológicos que son primordiales en la sobrevivencia del embrión en desarrollo, en este estudio se analizó la expresión de estas catepsinas durante diferentes etapas del desarrollo embrionario temprano en el pez dorado *S. lalandi*.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1. Ovogénesis y desarrollo ovocitario en peces teleósteos

La ovogénesis en los peces, es el proceso que transforma a las células germinales primordiales en huevos aptos para ser fecundados. Se puede dividir en dos etapas: crecimiento y maduración de los ovocitos (Nagahama y Yamashita, 2008).

#### 1.1 Crecimiento de los ovocitos

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 una fosfoglicoproteína, la 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 por los ovocitos en crecimiento a través de vesículas mediadas por receptores específicos (Hiramatsu *et al.*, 2002a). Estas vesículas, se fusionan con los lisosomas en el citoplasma cortical constituyendo los cuerpos multivesiculares y que paulatinamente se organizan en gránulos o glóbulos del vitelo (Carnevali *et al.*, 2006).

En peces teleósteos, se han descrito y clasificado diferentes tipos de VTGs; VTGA, VTGB y VTGC, agrupadas según su similitud en la estructura primaria y función fisiológica (Hiramatsu *et al.*, 2002b; Sawaguchi *et al.*, 2006). Estas VTGs endocitadas, sufren una primera proteólisis limitada, que resultará en las PVs. Las PVs corresponden a las

lipovitelinas de cadena pesada y a las lipovitelinas de cadena liviana. Además, se han descrito otras moléculas que acompañan a las PVs; las fosfovitas y un  $\beta$  componente en el COOH terminal (Hiramatsu *et al.*, 2002a,c; Sawaguchi *et al.*, 2006). Una vez finalizada la etapa de crecimiento que incluye la formación de las PVs, los ovocitos continúan el procesamiento de éste durante el periodo de maduración final, donde el huevo adquiere la flotabilidad positiva, junto con las características que lo hacen apto para la fecundación.

## **1.2 Maduración final del ovocito**

En peces teleósteos marinos pelágicos, 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 los aminoácidos libres (AALs) derivados de la proteólisis de las PVs, de manera que al aumentar la concentración de éstos, 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 es determinante en la maduración final del ovocito, así como en el desarrollo embrionario temprano.

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

Las responsables de la degradación del vitelo durante la ovogénesis y el desarrollo embrionario temprano en peces teleósteos, son las enzimas lisosomales denominadas catepsinas. 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*, una

especie pelágica, 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 RNA mensajero (mRNA) (Carnevali *et al.*, 2008). Específicamente, la catepsina D, responsable de un primer clivaje limitado de las VTGs, para producir las PVs (Carnevali *et al.*, 1999a), presentó 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 si 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).

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

El desarrollo embrionario en vertebrados ovíparos 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.*, 2007b).

En la lubina *Dicentrarchus labrax*, especie pelágica, 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. Igualmente,

la actividad máxima de las catepsinas A y L fue 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 el salmónido 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 sólo se expresó en la ovogénesis, presentando niveles muy bajos de sus transcritos durante el desarrollo embrionario temprano (Kwon *et al.*, 2001).

Los diferentes patrones de expresión y actividad enzimática de las catepsinas B, D y L en distintas especies de peces teleósteos, puede indicar que estas enzimas poseen un rol temporal y especie-específico durante la embriogénesis. Además, dada su función en el procesamiento del vitelo, la presencia de estas moléculas es fundamental en la sobrevivencia de los embriones, por lo cual es primordial conocer su expresión génica durante el desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi*.

#### **4. Expresión génica**

Los estudios de expresión génica conforman una herramienta esencial para identificar los factores y vías moleculares que controlan el desarrollo temprano normal de un individuo. La expresión génica, proceso por el cual la información de un gen es utilizada para la síntesis de una proteína o RNA, se puede medir idealmente mediante la detección de su producto final, no obstante, dada su compleja metodología es más fácil detectar uno de sus precursores, típicamente el mRNA e inferir indirectamente el nivel de expresión del gen. Existen varios métodos para medir el mRNA, entre ellos Northern blot, Microarrays, Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) y la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativa previa transcripción reversa (RT-qPCR, del inglés *Reverse Transcription*

*quantitative Polymerase Chain Reaction*). La RT-qPCR se describe como la herramienta de elección para la detección del mRNA (Bustin, 2000), producto de su alta sensibilidad, buena reproducibilidad, amplio rango dinámico de cuantificación y simplicidad tanto en el diseño experimental como en la ejecución de éste (Bustin, 2000; Pfaffl, 2004; Bustin *et al.*, 2005).

Además, la estrategia de cuantificación que se adopte en un experimento de RT-qPCR resulta primordial, siendo la cuantificación absoluta y relativa, las metodologías comúnmente utilizadas. La cuantificación absoluta, relaciona la cantidad del templado inicial con una curva de calibración, mientras que la cuantificación relativa mide los cambios relativos en los niveles de expresión de los mRNAs y se describe como el método adecuado para investigar cambios fisiológicos en la expresión de un gen (Pfaffl, 2004).

La cuantificación relativa o normalización, determina los cambios de los niveles del mRNA de un gen a través de múltiples muestras y lo expresa en forma relativa a los niveles de un gen de referencia endógeno no regulado (Pfaffl, 2004). La guía MIQE (del inglés, *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) señala a la normalización como un componente esencial para un experimento qPCR confiable al controlar las variaciones que existen en el rendimiento de la extracción y transcripción reversa y en la eficiencia de amplificación, permitiendo así comparar concentraciones del mRNA proveniente de diferentes muestras (Bustin *et al.*, 2009).

Los genes de referencias, se definen como aquellos genes necesarios para la supervivencia celular básica, donde la síntesis de su mRNA es considerada estable en los diversos tejidos o en las diferentes etapas de desarrollo y además, no sufren cambios producto de los tratamientos y condiciones experimentales (Thellin *et al.*, 1999). Se han utilizado frecuentemente como genes de referencia a gliceraldehído- 3- fosfato deshidrogenasa, albumina, actinas, tubulinas, ciclofilinas, microglobulinas, subunidades ribosomales 18S ó 28S, todos ellos presentes en células nucleadas y necesarios para la supervivencia celular. Sin embargo, numerosos estudios han revelado que muchos de estos genes son regulados y varían bajo diferentes condiciones experimentales (Thellin *et al.*, 1999; Bustin, 2000; Bustin, 2002; Vandesompele *et al.*, 2002; Pfaffl *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2007; Zhong *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2008). No obstante, el uso de ellos es comúnmente aceptado

como la estrategia de normalización más adecuada, pero sólo si su utilidad es experimentalmente validada según la estabilidad de su expresión en las muestras y en los diseños experimentales específicos (Bustin *et al.*, 2009).

Para el análisis de la estabilidad de la expresión de los genes de referencia, existen disponibles diferentes software con distintos modelos matemáticos que permiten facilitar este tipo de estudios, siendo BestKeeper (Pfaffl *et al.*, 2004), GeNorm (Vandesompele *et al.*, 2002) y NormFinder (Andersen *et al.*, 2004) los más reconocidos y aplicados. GeNorm determina la estabilidad de la expresión, basado en la comparación de la variación por promedio de un gen respecto a los genes de referencia analizados, utilizando los valores de los ciclos umbrales (Ct, del inglés *threshold cycle*) transformados en cantidades logarítmicas según la eficiencia de amplificación del gen (Vandesompele *et al.*, 2002). BestKeeper también se basa en un análisis de correlaciones pares de los genes de referencia, pero utilizando directamente los valores de los Ct (Pfaffl. *et al.*, 2004). NormFinder al igual que GeNorm, emplea los valores logarítmicos de los Ct, pero a diferencia de los dos programas anteriores incluye un análisis de las variaciones intra e intergrupales de cada gen (Andersen *et al.*, 2004).

Como se ha visto, el rol de las catepsinas es fundamental durante el procesamiento del vitelo, tanto en la ovogénesis como en el desarrollo embrionario temprano. Además, su presencia y actividad parecen ser especie-específicas y se asocian con la calidad de los huevos especialmente de especies marinas pelágicas como *S. lalandi*. La expresión y actividad de las catepsinas, es un tema no abordado en las especies pertenecientes al género *Seriola*. Por lo tanto, considerando las características de la biología reproductiva de *S. lalandi* y su potencial productivo, resulta fundamental conocer los mecanismos que determinan la calidad de los huevos y embriones en esta especie. El estudio de la expresión de las catepsinas durante las primeras etapas del desarrollo embrionario, parece ser una etapa inicial en la búsqueda de este conocimiento, sin olvidar que su correcta interpretación exige el uso de genes de referencia validados experimentalmente, para la normalización de la expresión durante el desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi*.

## **OBJETIVO GENERAL**

Analizar la expresión de las catepsinas B, D y L durante diferentes estadíos del desarrollo embrionario temprano del pez *S. lalandi*.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Evaluar la estabilidad en la expresión de seis genes constitutivos, para ser utilizados como referencia, en estudios de expresión génica durante el desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi*.
2. Evaluar la expresión relativa de los mRNAs que codifican para las catepsinas B, D y L, en distintas etapas del desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. Recolección de huevos y embriones**

Los huevos y embriones se obtuvieron de desoves de un stock de 100 reproductores silvestres capturados y mantenidos en cuatro estanques de 20.000 L en el Centro de Producción de juveniles de dorados de la empresa Acuino S.A., Caldera, Chile. Los reproductores se mantuvieron con temperaturas entre 20 y 24 °C y fotoperíodo de 12 horas de luz/día. Con estas condiciones, se logran desoves durante nueve meses. A través de un recolector instalado en cada estanque, se obtuvieron huevos y embriones en diferentes etapas del desarrollo embrionario temprano: huevos de aproximadamente 15 a 30 minutos después del desove y recién fecundados (E1), embriones de cuatro células (E2), 16 células (E3), blástulas (E4), embriones de 24 HPF (horas post fecundación) (E5) y embriones de 48 HPF (E6), según las descripciones hechas por Moran *et al.* (2007a). Además, y con el fin de estandarizar las técnicas de análisis de expresión génica, se recolectaron muestras de ovarios de hembras adultas, mediante la canulación del gonoporo. Tanto las muestras de huevos, como embriones y ovarios, se sumergieron inmediatamente en RNAlater® Solution, Ambion®. Las muestras se mantuvieron durante uno o dos días a 4 °C y luego se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

### **2. Expresión de catepsinas B, D y L durante el desarrollo embrionario temprano**

Para investigar la participación de las catepsinas B, D y L en la proteólisis de vitelo durante la embriogénesis de *S. lalandi*, se evaluó la expresión de estas enzimas, a través de RT-qPCR, en diferentes estados del desarrollo embrionario temprano de esta especie.

## **2.1 Extracción y purificación de RNA total**

El RNA total se extrajo de aproximadamente 50 huevos o embriones de cada estadio, mediante columnas de afinidad utilizando el Kit GeneJET™ RNA Purification (Fermentas Life Sciences), siguiendo las instrucciones del fabricante. Dada la fragilidad del RNA, se trabajó en una campana de flujo laminar y en condiciones ambientales libres de RNasas, hasta la conversión del RNA en DNA. Posteriormente, se analizó la integridad del RNA mediante electroforesis en geles de agarosa denaturante con formaldehído al 37% y bromuro de etidio al 1%, midiendo previamente la concentración de RNA a través de mediciones fluorométricas en un aparato Qubit® Fluorometer de Invitrogen™ utilizando el kit de cuantificación Qubit® RNA Assay, Invitrogen™ Molecular Probes®. Las muestras de RNA se almacenaron a –80 °C hasta su uso.

## **2.2 Transcripción Reversa (TR)**

Con el fin de eliminar el DNA genómico (gDNA) contaminante, se trataron las muestras de RNA con DNasa I, que corresponde a una endonucleasa que digiere DNA de hebra simple o doble, hidrolizando los enlaces fosfodiéster. Para esto, se utilizaron los reactivos del kit DNaseI RNase-free de Thermo Scientific y se siguieron las instrucciones del fabricante. Posteriormente, las muestras se procesaron para la TR, utilizando el conjugado enzimático SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen™) y las indicaciones del fabricante. Se incluyó un control negativo para la TR, con el fin de corroborar la ausencia de gDNA, al cual no se le adicionó la enzima SuperScript II RT™ y se completó el volumen con agua DEPC. La concentración del cDNA se determinó a través de mediciones fluorométricas utilizando el kit de cuantificación Qubit® ssDNA Assay (Invitrogen™ Molecular Probes®). Las muestras de cDNA se almacenaron a –20 °C hasta su uso en los protocolos de qPCR.

### 2.3 Diseño de partidores

Hasta la fecha, no existen secuencias publicadas para las catepsinas y genes de referencia en la especie *S. lalandi*. Debido a esto, los partidores para las catepsinas B, D y L se diseñaron en base a alineamientos de todas las secuencias publicadas en GenBank de 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). El alineamiento de las secuencias se realizó con el software ClustalX y se escogieron las regiones más conservadas, donde se diseñaron los partidores manualmente con el fin de obtener amplicones entre 100 y 200 pb. Por otro lado, en el diseño de los partidores de los genes de referencia, excepto para gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH), se utilizaron las secuencias de *Seriola quinqueradiata* publicadas en GenBank pertenecientes a cada uno de los genes empleados: factor de elongación 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ , N° acceso de la secuencia: AB032900.1),  $\beta$ -actina (ACTB, N° acceso de la secuencia: AB179839.1), subunidad ribosomal 18S (18S, N° acceso de la secuencia: AY850370.1), tubulina (TUB, N° acceso de la secuencia: AB461862.1) y subunidad  $\beta$ 2 de microglobulina (B2MIC, N° acceso de la secuencia: AB469146.1). De estas secuencias, se escogieron manualmente los partidores para obtener amplicones entre 100 y 200 pb. El diseño de los partidores de GAPDH, debido a que no está su secuencia publicada en *S. quinqueradiata*, se realizó en base a alineamientos de las secuencias de *D. labrax* (N° acceso de la secuencia: AY863148.1) y de *S. aurata* (N° acceso de la secuencia: DQ641630.1) siguiendo el mismo procedimiento descrito para los partidores de las catepsinas.

Los partidores diseñados tanto para los genes objetivos (catepsinas) como para los de referencia, se analizaron con el programa NetPrimer, cuyos criterios de selección fueron temperaturas de fusión ( $T_m$ , del inglés *melting temperature*) cercanas a 60 °C, con diferencias 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. En la Tabla 1, se observan las secuencias de los partidores diseñados para los genes de referencia y las catepsinas.

#### **2.4 PCR en tiempo real o qPCR**

La expresión de los genes de referencia, más los que codifican para las diferentes catepsinas, se estudiaron mediante qPCR. Para esto, se utilizaron los componentes del kit Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific), según las cantidades por reacción indicadas por el fabricante y señaladas en el Anexo 1. Las soluciones formuladas se cargaron en placas de 48 pocillos y en el termociclador en tiempo real Eco<sup>TM</sup> Real-Time PCR System de Illumina<sup>®</sup>, se realizaron las mediciones según las condiciones de los ciclos de temperatura dadas por el fabricante del kit empleado, las cuales se describen en el Anexo 2. Además, se agregaron controles negativos, formulados con todos los componentes del kit, excepto el templado o cDNA, con el fin de evaluar la contaminación de los reactivos y la presencia de dímeros. Además, se introdujeron los controles negativos de la TR vistos en el punto 2.2 de Materiales y Métodos.

Previo al análisis de expresión en las muestras objetivo de este trabajo, se estandarizaron y optimizaron las condiciones de los 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 las muestras de ovario.

### **2.4.1 Matriz de partidores**

Se evaluó la concentración óptima de los partidores seleccionados según lo recomendado por Bustin *et al.* (2009). Para esto, se realizaron experimentos de RT-qPCR, utilizando mezclas de diferentes combinaciones de concentración del *Forward* y *Reverse* de cada juego de partidores.

Los partidores liofilizados fueron reconstituidos a 100  $\mu\text{M}$  y se alicuotaron a 10  $\mu\text{M}$  para su uso. Se evaluaron tres diferentes concentraciones (0,2- 0,4- 0,6  $\mu\text{M}$ ) tanto para el *Forward* como para el *Reverse*, generando nueve combinaciones posibles entre ellos para cada gen en estudio. Se aplicaron los protocolos vistos en el punto 2.4 de Materiales y Métodos y cada una de las reacciones se realizaron con triplicado.

La elección de la mejor combinación de concentraciones de cada juego de partidores se realizó en base a los valores de los Ct (Ct, del inglés *threshold cycle*), que representan el ciclo de amplificación de la qPCR en el cual la detección del DNA de doble hebra, por medio de fluorescencia, traspasa un nivel umbral, es decir, supera significativamente la fluorescencia basal. Lo anterior ocurre en la fase exponencial temprana de la curva de amplificación, donde el valor del Ct es proporcional al número de copias o cantidad de cDNA inicial. Consecutivamente, a mayor cantidad de DNA en el templado inicial, mayor velocidad de incremento de la fluorescencia, produciendo un menor valor de su Ct (Bustin, 2000; Wong y Medrano *et al.*, 2005; Bustin *et al.*, 2009). Se escogieron las concentraciones con menor valor de los Ct y menor desviación estándar entre las repeticiones intraensayos. En la Tabla 2 se detallan las concentraciones óptimas de los partidores estudiados.

### **2.4.2 Eficiencia de la PCR**

Se midió la eficiencia de amplificación de la qPCR, según lo recomendado por Bustin *et al.* (2009). La eficiencia de amplificación representa la capacidad de una reacción qPCR para doblar el número de copias de las cadenas de cDNA en cada ciclo de amplificación, siendo el máximo teórico un 100% de eficiencia, es decir, la cantidad del producto se duplica en cada ciclo. La eficiencia de amplificación, se estimó a través de las curvas estándar de cada juego de partidores. Para esto se realizaron seis diluciones del cDNA de ovario, con factor

de dilución dos y se midieron los Ct de cada una de ellas. Se utilizó la concentración óptima de los partidores vistas en la Tabla 2 y los protocolos detallados en el punto 2.4 de Materiales y Métodos, realizando cada una de las reacciones con triplicado. La pendiente de la curva estándar representa la eficiencia de amplificación, a través de las siguientes fórmulas (Wong y Medrano, 2005):

$$\text{Amplificación exponencial (E)} = 10^{-1/\text{pendiente}}$$

$$\text{Eficiencia} = ((10^{-1/\text{pendiente}}) - 1) \times 100$$

En la literatura se mencionan rangos de eficiencias entre un 60% y un máximo de 110% con altos niveles de linealidad ( $R^2$  sobre 0,989) (Bustin, 2005). En la Tabla 2 se observan las eficiencias obtenidas de todos los partidores utilizados.

### **2.4.3 Expresión durante el desarrollo embrionario temprano**

Se midió la expresión de los genes de referencia y de los genes objetivos durante diferentes estadios del desarrollo embrionario temprano. Se utilizaron los protocolos señalados en el punto 2.4 de Materiales y Métodos, con la concentración óptima de los partidores vistas en la Tabla 2, realizando cada una de las reacciones con triplicado.

## **2.5 Cuantificación relativa**

Una de las principales sugerencias dadas por Bustin *et al.* (2009), es que la cuantificación relativa de la expresión génica mediante RT-qPCR bajo determinadas condiciones experimentales, requiere el estudio de la estabilidad de la expresión de los genes de referencia en distintas etapas del desarrollo y bajo las condiciones experimentales expuestas. Por lo tanto, previo al análisis de las catepsinas, se evaluó la expresión de EF-1 $\alpha$ , GAPDH, 18S, ACTB, TUB y B2MIC, en los diferentes estadios del desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi* empleados en este estudio. Para este análisis se realizaron los siguientes pasos:

- Se calcularon los promedios de los Ct de las repeticiones para cada muestra de cada uno de los genes de referencia y de los genes objetivos y se transformaron en

cantidades relativas denominadas *Quantity* (Q), mediante la fórmula “delta- Ct” que incluye la eficiencia de amplificación (E) (Vandesompele *et al.*, 2002; Pfaffl, 2004). Por lo tanto:

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

- Los valores Q se ingresaron al programa NormFinder, una aplicación para Microsoft Excel para determinar los genes de referencia óptimos. El algoritmo de este programa se basa en un modelo matemático de expresión génica y utiliza un marco estadístico para estimar no solo la variación global de la expresión de los genes candidatos, sino que también la variación entre los subgrupos de las muestras. NormFinder genera un valor de estabilidad a cada gen, que es una medida directa de la variación de la expresión estimada, permitiendo evaluar el error sistemático introducido cuando se usa el gen para la normalización. El modelo describe a  $y_{ij}$  como la medida logarítmica de la expresión para el gen  $i$  en la muestra  $j$  del grupo  $g$ , con un total de  $k$  genes,  $G$  grupos y un número de muestras en el grupo  $g$  de  $n_g$ . El modelo natural es escrito  $y_{ij}$  como la suma de tres términos (Andersen *et al.*, 2004):

$$y_{ij} = \alpha_{ig} + \beta_{gi} + \varepsilon_{ij}$$

El término  $\alpha_{ig}$  representa el nivel de expresión general para el gen  $i$  dentro del grupo  $g$ . El segundo término  $\beta_{gi}$  es la cantidad de mRNA en la muestra  $j$ . El último término  $\varepsilon_{ij}$  es la variación aleatoria causada por factores biológicos y experimentales, con un promedio cero y una varianza  $\sigma_{ig}^2$ . El programa estima la variación intragrupal  $\sigma_{ig}^2$  y la variación intergrupala medida como la variación en  $\alpha_{ig}$ ,  $g = 1, \dots, G$  (Andersen *et al.*, 2004).

La cuantificación de la expresión de los genes objetivos (catepsinas B, D y L), se realizó en forma normalizada, utilizando los datos de los dos genes de referencia más estables. Se calculó el Factor de Normalización para cada muestra de los diferentes estadios del desarrollo, siendo ambos desoves considerados en forma separada. El Factor de Normalización corresponde a la media geométrica de los Qs de cada muestra pertenecientes a los dos genes de referencia seleccionados. Con este valor se normalizó la expresión de las catepsinas B, D y L en los diferentes estadios del desarrollo embrionario de *S. lalandi*,

considerando siempre las muestras de ambos desoves como medidas independientes (Vandesompele *et al.*, 2002).

### 3. Análisis estadístico

Se consideraron dos desoves diferentes para la obtención de las muestras. En cada desove, se obtuvieron muestras pertenecientes a seis estadíos del desarrollo embrionario temprano y cada una compuesta por un *pool* de aproximadamente 50 embriones. Por lo tanto, cada estadío estuvo representado por dos muestras diferentes, provenientes de distintos desoves. Además, los experimentos de expresión durante el desarrollo embrionario tanto de los genes objetivos como de los genes de referencia, se repitieron al menos una vez y cada una de las reacciones se plantearon con triplicado, empleando el promedio de estas medidas para cada muestra de determinado desove. Las diferencias en la expresión relativa de cada catepsina durante el desarrollo embrionario se estudiaron por análisis de varianza utilizando el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

$Y_{ij}$  = Observación o expresión promedio relativa en el estadío  $i$  del desove  $j$ .

$\mu$  = Media general o poblacional.

$\tau_i$  = Expresión promedio del estadío  $i$  ( $i= 1: E1; 2: E2; 3: E3; 4: E4; 5: E5; 6:E6$ ).

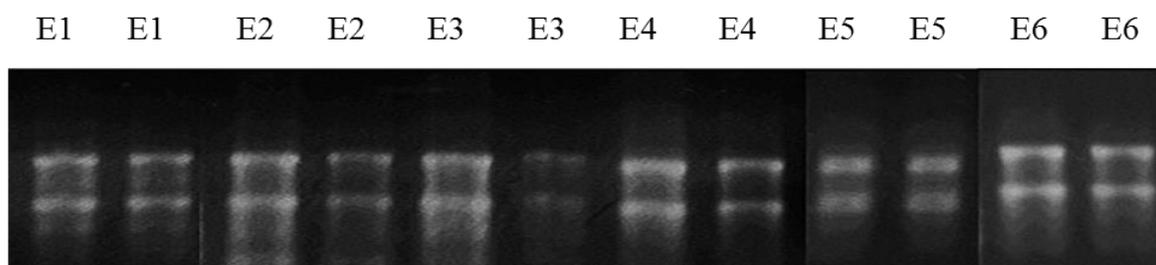
$\varepsilon_{ij}$  = Error aleatorio asociado a la observación  $Y_{ij}$ .

Las diferencias se determinaron con la prueba de Duncan. El nivel de significancia utilizado fue de  $p<0,05$ .

## RESULTADOS

### 1. Calidad del RNA total

La calidad del RNA es esencial para todos los procesos que involucra un análisis de expresión génica (Bustin *et al.*, 2009). Por lo tanto, se seleccionaron sólo las muestras constituidas por RNA de alta calidad, según las electroforesis en geles de agarosa, donde se distinguieron ambas bandas de sus respectivos RNAs, como se observa en la Figura 1, y se desecharon las muestras cuyo RNA estuviera degradado.



**Figura 1: Electroforesis del RNA total de las muestras de estadios del desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi*.** Realizado con formaldehído al 37% y bromuro de etidio al 1%. RNA total extraído y purificado de los estadios E1, E2, E3, E4, E5 y E6 de *S. lalandi*.

### 2. Partidores

Las secuencias de los partidores, diseñados y empleados en los experimentos, para los genes de referencia y objetivos (catepsinas), se observan en la Tabla 1, con su función biológica y las respectivas Tm utilizadas.

Tabla 1: Función, secuencias y Tm de los genes de referencia y objetivos (catepsinas).

Nombre del gen	Función	Secuencia <i>Forward</i> (F) 5'-3' Secuencia <i>Reverse</i> (R) 5'-3'	Tm*
<b>Gliceraldehído- 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)</b>	Glicólisis	F: CCCTTCATCGACCTGGAGTA R: GAGCAGAGGCCTTCTCAATG	55°C
<b>Factor de elongación 1 alfa (EF-1<math>\alpha</math>)</b>	Translocación del polipéptido naciente desde el sitio ribosomal A al P.	F: CTGGTTCAAGGGATGGAAGA R: TCCAATACCGCCAATTTTGT	55°C
<b><math>\beta</math>-actina (ACTB)</b>	Componente del citoesqueleto y mediador de la motilidad celular	F: AGGGAAATCGTGCGTGACAT R: GCTGAAGTTGTTGGGCGTTT	57°C
<b>Subunidad ribosomal 18S (18S)</b>	Constituyente de la subunidad ribosomal menor	F: GCTCGTAGTTGGATCTCGGG R: GGTGAGGTTTCCCGTGTGA	57°C
<b>Tubulina (TUB)</b>	Proteína estructural del citoesqueleto	F: TCATCAAGATTATCAGGAGGCG R: GGAAGCATAACCATGTAGAGG	55°C
<b>Subunidad <math>\beta</math>2 de microglobulina (B2MIC)</b>	Subunidad menor del MHC	F: GGAAGGCTTGATAACATCTGC R: CGTACCCACTCTTCTCTTGCTA	55°C
<b>Catepsina B</b>	Proteólisis del vitelo	F: GTAATGGTGGCTACCCTTCA R: CATACTGAATCTGCTCCTCG	54°C
<b>Catepsina D</b>	Proteólisis del vitelo	F: GCCAAGTCCAGCACATACG R: ACAGAGATGCGTGGGTAGG	56°C
<b>Catepsina L</b>	Proteólisis del vitelo	F: ACTACAACCTGCCAACGAC R: AACTGGAAAGACTCGTGACC	54°C

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

### 3. Amplificación específica de partidores

Uno de los principales problemas que existen en los estudios de qPCR con detección química a través de SYBR Green (o colorantes intercalantes que se adhieren a todo DNA de doble hebra y no selectivamente al gen), es la amplificación inespecífica de la polimerasa y su consecuente detección, generando finalmente, resultados no confiables. Por este motivo, sólo se emplearon los juegos de partidores con amplificación específica de la polimerasa, determinada por una curva de fusión con un único peak y ausencia de amplificación en los blancos sin templado. En el Anexo 3, se observan las curvas de fusión de los genes estudiados.

#### 4. Concentración óptima de los partidores

La Tabla 2 describe las concentraciones que fueron seleccionadas para cada uno de los juegos de partidores. Los criterios de selección que se utilizaron fueron: menor valor de los Ct y menor desviación estándar entre las repeticiones de las curvas de amplificación.

#### 5. Eficiencia de amplificación de los genes de referencia y objetivos

En la cuantificación relativa es particularmente importante determinar la eficiencia de amplificación de los diferentes genes involucrados en el estudio. La Tabla 2 muestra que sólo se obtuvieron eficiencias cercanas a 2 (Eficiencia=  $10^{-1/\text{pendiente}}$ , donde el resultado 2 representa un 100% de eficiencia según la fórmula:  $((10^{-1/\text{pendiente}}) - 1) \times 100$ ) (Wong y Medrano, 2005)), excepto 18S y catepsina L. Estos dos últimos casos, a pesar de tener eficiencias lejanas al porcentaje teórico ideal ó 100%, de igual manera se incluyeron en el estudio ya que su amplificación fue específica y se obtuvieron en la mayoría coeficientes de correlación, en las curvas estándar, sobre 0,9. En el Anexo 4 se observan las curvas estándar de los genes estudiados.

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

Nombre del Gen	Concentración partidores	Eficiencia de amplificación
<b>GAPDH</b>	F: 0,6µM; R: 0,4µM	1,99
<b>EF-1α</b>	F: 0,6µM; R: 0,6µM	1,94
<b>ACTB</b>	F: 0,2µM; R: 0,2µM	2,04
<b>18S</b>	F: 0,4µM; R: 0,6µM	2,31
<b>TUB</b>	F: 0,6µM; R: 0,6µM	1,88
<b>B2MIC</b>	F: 0,6µM; R: 0,4µM	2,02
<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

## **6. Análisis de los genes de referencia en el desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi***

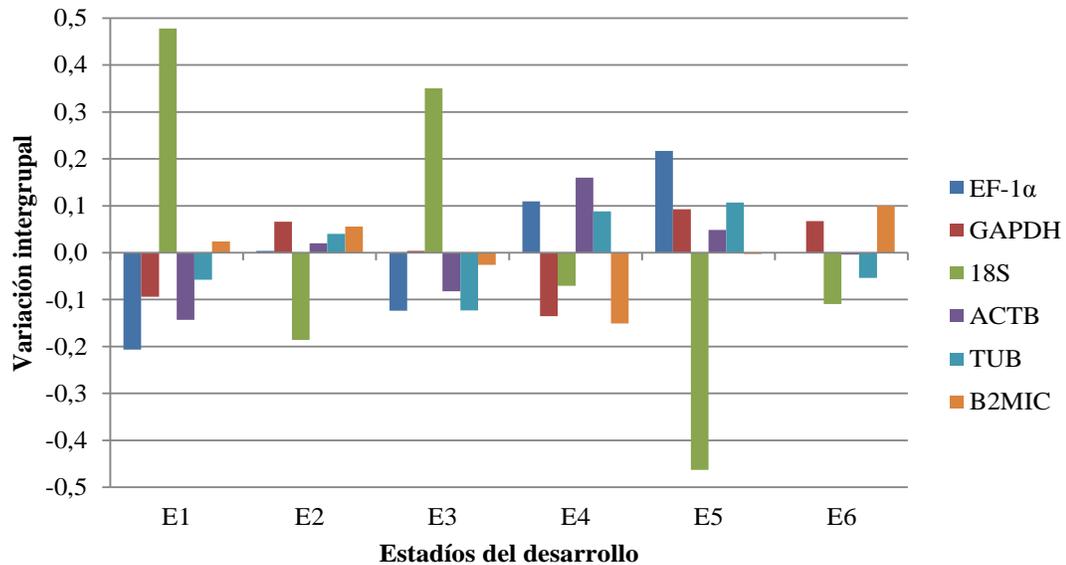
Se evaluó la estabilidad de la expresión de GAPDH, EF-1 $\alpha$ , ACTB, 18S, TUB y B2MIC, en diferentes estadios del desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi*. Para esto, se calcularon los Qs de los seis genes de referencia en cada una de las muestras pertenecientes a los seis estados de la embriogénesis de ambos desoves. Estos valores se ingresaron al software NormFinder para Microsoft Excel y se ejecutó el programa.

La Tabla 3 describe las variaciones intragrupalas de los seis genes de referencia de este estudio, es decir, las variaciones de los Qs de las diferentes muestras pertenecientes a un mismo estadio del desarrollo embrionario, para cada uno de los genes constitutivos de este estudio. Según la Tabla 3, ACTB fue el gen que presentó menor variabilidad intragrupal con muy baja o ninguna variación en la mayoría de los estadios del desarrollo (menor o igual a 0,002) excepto durante la blastulación (E4) con una medida igual a 0,052. El gen EF-1 $\alpha$  presentó muy bajos valores de variación (menores a 0,002) en E1, E2, E3 y E6, no así en E4 y E5, con medidas de 0,052 y 0,033, respectivamente. De manera similar, el gen TUB presentó variaciones muy bajas (menores a 0,005) en los estadios E2, E3, E5 y E6, en cambio, en los estadios E1 y E4 presentó valores mayores, 0,037 y 0,044, respectivamente. En un nivel de variabilidad un poco mayor, se situó el gen 18S, donde los estadios presentaron valores entre 0,035 y 0,077, con excepción sólo de E2 que fue cercano o igual a cero. Finalmente, los genes GAPDH y B2MIC presentaron una inestabilidad intragrupal superior a todos los genes, dado fundamentalmente por sus valores superiores de variación en los estadios E4 y E5, donde B2MIC presentó medidas sobre 0,5. En general, considerando a todos los genes, se observó que los embriones en blastulación (E4) y de 24HPF (E5), presentaron las mayores magnitudes en comparación a los otros estadios del desarrollo.

Tabla 3: Valores de variación intragrupal de los genes de referencia en distintos estadios del desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi*.

	<b>E1</b>	<b>E2</b>	<b>E3</b>	<b>E4</b>	<b>E5</b>	<b>E6</b>
<b>EF-1<math>\alpha</math></b>	0,000	0,002	0,002	0,052	0,033	0,000
<b>GAPDH</b>	0,001	0,003	0,002	0,103	0,329	0,000
<b>18S</b>	0,077	0,000	0,035	0,040	0,050	0,043
<b>ACTB</b>	0,000	0,000	0,001	0,052	0,002	0,000
<b>TUB</b>	0,037	0,005	0,004	0,044	0,002	0,000
<b>B2MIC</b>	0,060	0,001	0,003	0,567	0,757	0,088

La Figura 2 detalla las variaciones intergrupales, es decir, la diferencia que existe entre una medida promedio de los Qs pertenecientes a las muestras de un determinado estadio y gen y el valor promedio de estas medidas de todos los estadios del mismo gen de referencia. Se observa en esta Figura que los genes B2MIC, ACTB, GAPDH y TUB presentaron niveles de variación intergrupales similares, siendo en todos los casos menores a  $\pm 0,2$ . EF-1 $\alpha$  manifestó medidas de diferencias superiores a  $\pm 0,2$  en los estadios E1 y E5. 18S presentó valores de variación intergrupales superiores a  $\pm 0,3$  en los estadios E1, E3 y E5, siendo por lo tanto, el gen con mayor variabilidad en los valores de expresión entre los diferentes estadios.



**Figura 2: Variación Intergruppal de los genes de referencia en estadios del desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi*.**

Finalmente, la aplicación NormFinder definió un valor de estabilidad para cada gen, además determinó el gen más estable, y por último, los dos genes de referencia más adecuados para la normalización. El valor de estabilidad es inversamente proporcional a la estabilidad de la expresión, por lo tanto, según los valores que se describen en la Tabla 4, ACTB fue el gen más estable (valor de estabilidad 0,093), seguido por TUB (valor de estabilidad 0,119) y EF-1 $\alpha$  (valor de estabilidad 0,128). Los genes con expresión menos constantes fueron GAPDH (valor de estabilidad 0,162), 18S (valor de estabilidad 0,197) y B2MIC (valor de estabilidad 0,285). Por lo tanto, los dos genes de referencia de este estudio, cuyos niveles de expresión son similares en los distintos estadios del desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi* y por lo tanto, los más indicados para ser empleados en la normalización de la expresión de los genes objetivos (catepsinas), fueron ACTB y TUB con un valor de estabilidad conjunto igual a 0,103.

Tabla 4: Valores de estabilidad de los genes de referencia.

Gen	Valor de estabilidad
ACTB	0,093
TUB	0,119
EF-1 $\alpha$	0,128
GAPDH	0,162
18S	0,197
B2MIC	0,285

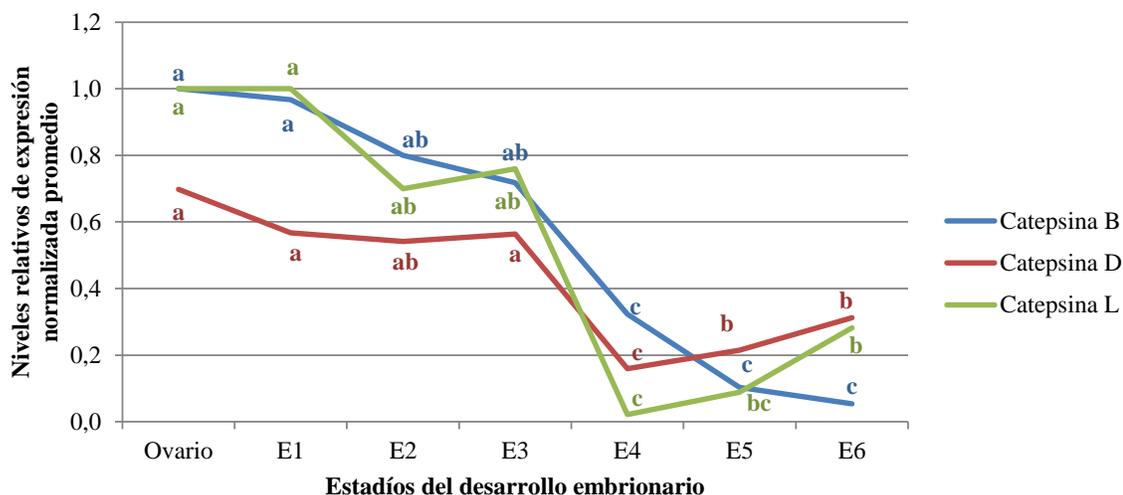
### 7. Expresión de las catepsinas en el desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi*

Se midió la expresión normalizada de las catepsina B, D y L en diferentes estadios del desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi*, utilizando a ACTB y TUB en la normalización.

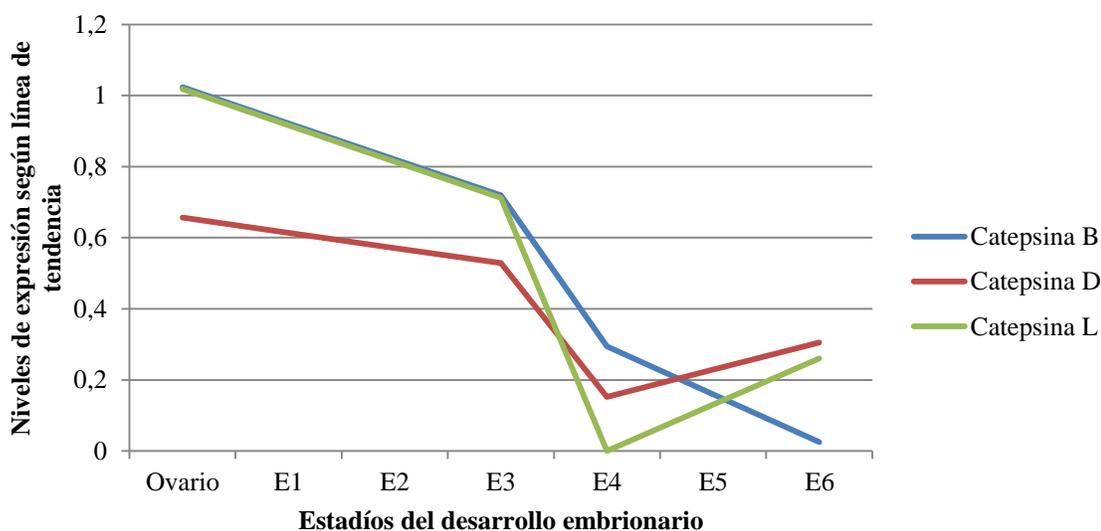
En la Figura 3 se observan los niveles relativos de expresión promedio para las tres catepsinas durante los distintos estadios del desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi*, incluyendo la muestra de ovario como control positivo. Catepsina B, D y L presentaron niveles altos de expresión en las muestras de ovarios y primeros estadios, E1, E2 y E3. Luego, en el estadio E4 caen los niveles de expresión en forma significativa ( $p < 0,05$ ) en comparación a las muestras de ovarios y estadios anteriores. Posterior a la blastulación (E4), en catepsina B se observa una disminución no significativa ( $p > 0,05$ ) de la expresión en los estadios E5 y E6, sin embargo, en catepsina D y L hay un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de sus niveles de expresión. En general, la expresión de las tres catepsinas es menor en los estadios más tardíos E4, E5 y E6, en comparación a las muestras de ovarios y E1.

En la Figura 4, se observan las líneas de tendencia de los niveles relativos de expresión normalizados para las tres catepsinas, divididas en dos grupos, el primer grupo incluye la muestra de ovario, E1, E2 y E3 y el segundo grupo, E4, E5 y E6. Se observa que las tres catepsinas, en el primer grupo, fueron disminuyendo levemente sus niveles de expresión en comparación con el estadio anterior, siendo mayor la expresión en la muestra de ovario, además catepsina B y L presentaron tendencias muy similares. En E4, blástula, la expresión de las tres catepsinas cae en forma brusca. Luego, en el segundo grupo, catepsina B

presentó una disminución de la expresión en los estadios E5 y E6, en cambio, catepsina D y L aumentaron sus niveles, siendo más inclinada la recta en catepsina L.



**Figura 3: Expresión Normalizada promedio para catepsina B, D y L en distintos estadios del desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi*.** Promedios con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).



**Figura 4: Líneas de tendencia de expresión de las catepsinas B, D y L en los estadios del desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi*.** Se dividió cada tendencia en dos grupos, el grupo 1 incluye ovario, E1, E2 y E3 y el grupo 2 E4, E5 y E6. Catepsina B grupo 1:  $y = -0,1014x + 1,1246$ ,  $R^2 = 0,954$ ; grupo 2:  $y = -0,1345x + 0,4288$ ,  $R^2 = 0,882$ . Catepsina D grupo 1:  $y = -0,0427x + 0,6993$ ,  $R^2 = 0,6018$ ; grupo 2:  $y = 0,0763x + 0,0763$ ,  $R^2 = 0,9754$ . Catepsina L grupo 1:  $y = -0,102x + 1,1201$ ,  $R^2 = 0,6997$ ; grupo 2:  $y = 0,1302x - 0,1297$ ,  $R^2 = 0,9267$ .

## DISCUSIÓN

### 1. Análisis de estabilidad de los genes de referencia

El desarrollo embrionario temprano de distintas especies de animales, se caracteriza por divisiones rápidas y sincrónicas que subdividen al cigoto en una gran población de blastómeros. Este periodo es seguido por una etapa llamada transición de la blastulación media (MBT, del inglés *midblastula transition*) que se identifica por un ciclo celular más largo, con pérdida de la sincronía celular y la activación de la transcripción cigótica y motilidad celular, los cuales son procesos esenciales para las siguientes etapas del desarrollo (Newport y Kirschner, 1982). En peces, existe información que indicaría que la acumulación de los transcritos cigóticos también ocurre durante la MBT, como en el pez cebra *Danio rerio* (Kane y Kimmel, 1993). En diversas especies de peces, además, se ha observado un aumento del mRNA durante la blastulación o cercano a ella, lo cual reflejaría la activación de los genes cigóticos (Zhong *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2008). De la misma manera, en este estudio, los valores promedios de los Ct (datos no mostrados) de la mayoría de los genes de referencia disminuyeron en el estadio de blástula (E4) y en embriones de 24HPF (E5), lo que revela el aumento del nivel del mRNA de cada uno de ellos, pudiendo ser consecuencia del inicio de la activación de la transcripción de los genes cigóticos.

Por otro lado, como ya se mencionó anteriormente, el uso de genes de referencia es ampliamente aceptado como la estrategia de normalización más adecuada en la cuantificación relativa de los datos obtenidos desde la RT-qPCR, sin embargo, su utilidad debe ser experimentalmente validada según la estabilidad de su expresión para las muestras y los diseños experimentales específicos (Bustin *et al.*, 2009). En este trabajo, ACTB resultó ser el gen con expresión más estable durante los estadios del desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi*. Las actinas, son un componente esencial del citoesqueleto, que poseen funciones claves en procesos celulares, que incluyen la motilidad celular, la división celular y la regulación de la expresión de genes, y en particular, la isoforma  $\beta$  es requerida para el desarrollo embrionario temprano por su rol fundamental en la regulación de la

migración celular y expresión génica (Bunnell *et al.* 2011). Por lo tanto, la expresión en un nivel constante de ACTB durante las diferentes etapas del desarrollo embrionario temprano, sería compatible con el rol de esta molécula durante la embriogénesis. En *D. rerio*, ACTB ha sido el gen de referencia más comúnmente usado para la normalización de datos provenientes de estudios RT-qPCR (McClelland *et al.*, 2006; Andreasen *et al.*, 2006) y en el trabajo realizado por Tang *et al.* (2007) estuvo entre los tres genes de referencia más estables durante el desarrollo embrionario de este pez. Asimismo, durante el desarrollo embrionario y larvario del pez plano halibut del Atlántico *Hippoglossus hippoglossus*, ACTB también resultó ser uno de los genes de referencia más adecuado para estudios qPCR (Fernandes *et al.*, 2008). Adicionalmente, TUB fue el segundo gen más constante durante el desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi*. Este resultado coincide con lo obtenido en el estudio ya mencionado en *H. hippoglossus*, donde TUB también resultó ser uno de los genes menos variable (Fernandes *et al.*, 2008). La información que existe en la literatura junto con los resultados obtenidos en este trabajo, señalan a TUB como un gen de referencia con expresión estable durante las etapas del desarrollo embrionario de algunas especies de peces, lo cual concuerda con el rol de esta molécula durante la embriogénesis, ya que es el principal constituyente de los polímeros de microtúbulos, los cuales son vitales para muchos procesos del desarrollo embrionario, incluyendo el primer movimiento celular o epibolia que ocurre durante la gastrulación y además, en la cohesión de los blastómeros postcitocinéticos vistos en el pez cebra (Solnica-Krezel y Driever, 1994). Por lo tanto ambos genes, ACTB y TUB, serían referencias adecuadas para el desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi* y de otras especies, como por ejemplo, *H. hippoglossus*.

Por otro lado, los transcritos de EF-1 $\alpha$  presentaron niveles adecuados de estabilidad, sin embargo, debido a su mayor variabilidad intergrupar, se situó en un nivel inferior de estabilidad en comparación a TUB y por este motivo se decidió no emplearlo en la normalización de la expresión de las catepsinas. EF-1 $\alpha$ , en la literatura, ha resultado estar dentro tanto de los genes menos estables durante la embriogénesis, como en *P. olivaceus* (Zhong *et al.*, 2008), así como también dentro de los genes más estables del desarrollo embrionario, como es el caso de *H. hippoglossus* (Fernandes *et al.*, 2008) y de *D. rerio* (Tang *et al.* 2007). En cambio GAPDH, presentó niveles intermedios de estabilidad,

producto de su alta variabilidad intragrupal en los estadios E4 y E5. Esto podría señalar que sería un gen regulado durante el desarrollo embrionario de *S. lalandi*, con mayores cambios en comparación a los mRNA de ACTB, TUB y EF-1 $\alpha$ . Se ha visto en varias especies de peces que GAPDH es uno de los genes menos estables durante el desarrollo embrionario, como de *D. rerio* (Tang *et al.* 2007), del pez plano hirame *Paralichthys olivaceus* (Zhong *et al.*, 2008) y de *H. hippoglossus* (Fernandes *et al.*, 2008), siendo inapropiado como referencia en estos peces y en *S. lalandi*.

Por otro lado, los genes 18S y B2MIC presentaron la expresión menos estable en los estadios del desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi*. La subunidad ribosomal 18S presentó la mayor variación intergrupala, por lo cual se calificó como uno de los genes menos estables. Una situación similar se observó durante el desarrollo embrionario y larvario del pez *H. hippoglossus* (Fernandes *et al.*, 2008). El RNA ribosomal constituye la mayor parte del RNA total y se correlaciona con la masa total del RNA, pero eso no necesariamente significa que sea un buen control endógeno, es más, se menciona que el RNA total y los niveles de RNA ribosomal no son referencias adecuadas debido al desequilibrio que se ha observado entre sus fracciones y las del mRNA (Solanas *et al.*, 2001). Además, se ha visto que la transcripción del RNA ribosomal es afectado por factores biológicos y farmacológicos (Warner, 1999) por lo que tampoco serían adecuados como controles endógenos. Otros inconvenientes para el uso de estas moléculas como genes de referencia, es su ausencia en las muestras de mRNA purificado y su mayor abundancia comparada con el mRNA objetivo, lo cual le resta exactitud a los valores basales en los análisis de RT-qPCR (Vandesompele *et al.*, 2002). Por último B2MIC, que forma parte del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I y cuya expresión se encuentra en todas las células nucleadas (Zhao *et al.*, 2008), fue el gen con expresión menos estable durante el desarrollo embrionario temprano, dado fundamentalmente por su mayor variación intragrupal en comparación a los otros genes. Esta variación intragrupal, se manifestó principalmente en los estadios E4 y E5, por lo que este gen sería altamente regulado, con cambios en la expresión especialmente durante la MBT de *S. lalandi* y por lo tanto, no sería adecuado para la normalización, al igual que 18S, en estudios de expresión durante el desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi*.

En resumen, los niveles de los transcritos de ACTB y de TUB, indican que ambos genes constituyen referencias adecuadas durante el desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi*, para normalizar la expresión de distintos genes de interés científico y en este caso, de las catepsinas B, D y L, con el fin de conocer algunos mecanismos moleculares que serían determinantes en la calidad de huevos y embriones de *S. lalandi*.

## **2. Expresión normalizada de las catepsinas B, D y L en distintos estadios del desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi***

Una gran variedad de mRNAs de origen materno son almacenados en los ovocitos y transferidos a los huevos fecundados. Los RNAs provenientes de la madre, son los encargados de regular el inicio del desarrollo embrionario hasta que ocurra la MBT (Kwon *et al.*, 2001; Fernández *et al.*, 2013) durante la blastulación, siendo en este estudio representada por el estadio E4. Los niveles de expresión para las catepsinas B, D y L en huevos de aproximadamente 15 a 30 minutos después del desove y recién fecundados (E1) hasta (E3) no presentaron diferencias significativas a los niveles observados en las muestras de ovarios, lo cual indicaría que los niveles de expresión maternos se mantienen constantes durante los primeros estadios del desarrollo, y además, que las enzimas lisosomales encargadas de la proteólisis del vitelo pueden ser almacenadas y transferidas no sólo como proenzimas, sino también como mRNAs.

En las tres catepsinas, se observó una disminución general de la expresión normalizada durante la embriogénesis, con valores significativamente menores ( $p < 0,05$ ) durante los estadios de blastulación (E4) y embriones de 24 HPF (E5) y 48 HPF (E6), en comparación a los huevos recién fecundados (E1). La disminución de la expresión de estas enzimas durante la embriogénesis temprana, también se observó en la trucha arcoíris *O. mykiss* donde el mRNA de las catepsinas D y L fueron mayores en huevos antes de la fecundación y de 2 HPF, en comparación a estadios del desarrollo más avanzados. Sin embargo, en esta especie, catepsina B presentó muy baja expresión durante el desarrollo embrionario, por lo que se asoció sólo al período vitelogénico de la ovogénesis (Kwon *et al.*, 2001). A diferencia del estudio anterior, en la lubina *D. labrax* la actividad de catepsina B estuvo

presente durante todos los estadios del desarrollo embrionario, alcanzando su *peak* de actividad en el estadio de mórula, disminuyendo luego en los siguientes estadios hasta la eclosión de la larva (Carnevali *et al.*, 2001). En *S. lalandi*, catepsina B, presentó niveles de expresión similares al patrón de actividad que se observó en *D. labrax*. La trucha arcoíris, a diferencia del pez dorado *S. lalandi* y de la lubina *D. labrax*, es un pez demersal de agua dulce, cuyos huevos desovados se mantienen en el fondo de la columna de agua, sin adquirir la capacidad de flotabilidad, debido a que su proceso de hidratación es mucho menor y por ende, posee una menor proteólisis del vitelo dada por las catepsinas, en comparación, a las especies pelágicas como *S. lalandi* (Cerdà, 2009). Por lo tanto, las diferencias en la expresión de las catepsinas de la trucha arcoíris y del pez dorado, se pueden atribuir a las características fisiológicas propias de cada especie y en particular, a las divergencias que existen en la actividad proteolítica de las catepsinas y procesamiento de las proteínas del vitelo.

La expresión normalizada de las catepsinas B, D y L de *S. lalandi*, disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) en el estadio de blástula (E4), en comparación a etapas más tempranas, lo que podría reflejar el cambio que sufre la expresión de éstas enzimas durante la MBT, ya que corresponden a genes principalmente de tipo materno, y esto indicaría que cuando se inicia la transcripción de los genes cigóticos, sus niveles disminuyen. Este modelo de expresión se asemeja en parte con lo observado en la dorada *S. aurata* (Fernández *et al.*, 2013), donde se seleccionó un grupo de genes que tendrían un origen materno y un rol en la regulación del desarrollo embrionario y por ende, en la calidad de los huevos; incluyendo dentro de este grupo a las catepsinas D y L. Todos los genes manifestaron el mismo patrón de expresión, en el cual disminuyeron después del estadio de blástula, en particular, durante la gastrulación, lo que da cuenta de una posible función de los genes maternos en la regulación del desarrollo embrionario temprano y que podrían, por lo tanto, funcionar como indicadores de la calidad de los huevos (Fernández *et al.*, 2013).

Posterior a la blastulación, se observó un aumento significativo de la expresión de catepsina D y L. En *S. aurata*, se observó un alza significativa de la expresión de catepsina L y no significativa de catepsina D, posterior a la blastulación y gastrulación (Fernández *et al.*, 2013). La diferencia en catepsina D, se puede atribuir a las características propias de cada

especie durante el desarrollo embrionario, donde predomina la presencia de los genes de catepsina L en *S. aurata* y de ambas enzimas en *S. lalandi*. Estos resultados podrían indicar que los genes de catepsina D y L son transcritos por el propio embrión luego del MBT, no así catepsina B, y estarían involucradas en la proteólisis del vitelo durante el resto del periodo de alimentación endógena del embrión y catepsina B participaría fundamentalmente al inicio del desarrollo embrionario hasta la blastulación.

Por otro lado, respecto a la función que cumplen las catepsinas B, D y L en el desarrollo embrionario temprano, se ha visto que son las principales enzimas encargadas de la proteólisis del vitelo, generando finalmente los AALs (Carnevali *et al.*, 2001; Carnevali *et al.*, 2006). En el trabajo realizado por Moran *et al.* (2007b) en *S. lalandi* se determinó que el desarrollo embrionario temprano de esta especie depende principalmente del pool de AALs como fuente de energía metabólica y se comprobó que disminuyen rápidamente durante la embriogénesis hasta que ocurre la eclosión de la larva. Sin embargo, esta disminución no se acompañó de un incremento del contenido de proteínas de los embriones y además, hubo un aumento de las concentraciones internas de amonio, por lo tanto, los AALs no se destinarían como fuente anabólica sino sólo como un recurso energético. Consistente con los resultados obtenidos en este estudio, en relación a la disminución general en la expresión de las catepsinas B, D y L, durante el desarrollo embrionario de *S. lalandi*, se ha observado que durante la embriogénesis de esta especie, también disminuyen los niveles de AALs (Moran *et al.*, 2007b). Por lo tanto, se podría inferir que un rol principal de las catepsinas sería la proteólisis del vitelo para formar AALs, los cuales son determinantes al generar el ambiente osmótico adecuado para que se produzca la hidratación final del ovocito y al proveer energía al embrión temprano durante su periodo de alimentación endógena.

Con esto último, se comprende que la presencia y actividad de estas enzimas puede ser determinante en la calidad de los huevos y embriones de *S. lalandi*, así como se ha propuesto en otras especies de peces, especialmente del tipo pelágico. Por ejemplo, en *D. labrax*, la actividad enzimática de catepsina D es significativamente mayor en los huevos que se hunden en la columna de agua, es decir, huevos de mala calidad, en comparación a los huevos de buena calidad o flotantes. Por el contrario, catepsina L presenta mayor

actividad en los huevos de buena calidad en comparación a los huevos que se hunden (Carnevali *et al.*, 2001). Esto sugiere que estas catepsinas puedan ser empleadas como marcadores de la calidad de los huevos y embriones (Carnevali *et al.*, 2001; Carnevali *et al.*, 1999b; Fernández *et al.*, 2013). Además, catepsina D se ha relacionado con los procesos apoptóticos de diferentes tipos de células (Jia y Zhang, 2009) y su mayor actividad en los huevos de mala calidad se relacionaría con la muerte celular programada de estos huevos. En este estudio, se obtuvieron sólo huevos y embriones flotantes, utilizados con normalidad en los procesos productivos, y se observó que el mRNA de catepsina L fue más abundante que los transcritos de catepsina D, lo que coincide con los niveles de actividad de estas enzimas que se han reportado en la literatura (Carnevali *et al.*, 2001). Sería interesante conocer los niveles de expresión de las catepsinas durante la maduración final del ovocito junto con los niveles de actividad de estas enzimas durante la ovogénesis y desarrollo embrionario, con el fin de tener un conocimiento íntegro del rol de estas moléculas durante la maduración final del ovocito y el desarrollo embrionario temprano del pez dorado *S. lalandi*.

## CONCLUSIÓN

El pez dorado *S. lalandi*, es una especie marina con un alto potencial productivo y exportador, sin embargo, su acuicultura se ha visto limitada por la producción de huevos y embriones de baja calidad. Una de las principales causas de esta deficiencia, sería el procesamiento insuficiente del vitelo durante la ovogénesis y el desarrollo embrionario temprano. Se ha determinado, que las catepsinas B, D y L son las principales enzimas lisosomales involucradas en la proteólisis del vitelo (Carnevali *et al*, 2001; Carnevali *et al.*, 2006.).

Se analizaron los patrones de expresión de las catepsinas B, D y L durante el desarrollo temprano del pez dorado. Se evaluó la expresión de seis genes de referencia durante los diferentes estadios del desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi*, donde los niveles de ACTB y TUB resultaron ser los menos variables y por ende, los más indicados para la normalización de la expresión de las catepsinas.

Se observó que las tres catepsinas se expresaron durante los primeros estadios con niveles similares a las muestras de ovarios, lo que reflejaría el mRNA materno que es almacenado en el ovocito maduro y permanece en niveles cercanos y que, durante la blastulación, periodo en que ocurriría la MBT, disminuyen sus niveles de transcripción ( $p < 0,05$ ), dando cuenta de una posible función de estos genes maternos en la regulación del desarrollo embrionario. Además, catepsina D y catepsina L presentaron un aumento posterior a la blastulación, lo que indicaría que estas enzimas podrían ser transcritas por el propio embrión para continuar con la proteólisis del vitelo durante el periodo de alimentación endógena, no así catepsina B, cuyos niveles disminuyeron y participaría principalmente en los primeros estadios. Se determinó una disminución general de la expresión normalizada a través de las diferentes etapas del desarrollo temprano de las catepsinas, lo cual se asemeja a los niveles de AALs detectados por Moran *et al.* (2007b). Este patrón de expresión podría ser el reflejo de una de las principales funciones de estas enzimas, que consisten en crear la presión osmótica necesaria para que se produzca la hidratación del ovocito y en proveer a

los embriones tempranos de su principal fuente de energía; ambas, a través de la formación de los AALs derivados de la proteólisis de vitelo.

Finalmente, dado su rol fundamental en la formación de un ovocito viable y en la fisiología normal del desarrollo embrionario temprano, las catepsinas podrían funcionar como indicadores de la calidad de los huevos y embriones de *S. lalandi* y de otras especies de peces pelágicos.

## BIBLIOGRAFÍA

**ANDERSEN, C.; JENSEN, J.; ORNTOFT, T.** 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR Data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 64:5245-5250.

**ANDREASEN, E.; MATHEW, L.; LÖHR, C.; HASSON, R.; TANGUAY, R.** 2006. Aryl hydrocarbon receptor activation impairs extracellular matrix remodeling during Zebra Fish fin regeneration. *Toxicol. Sci.* 95(1): 215-226.

**BUNNELL, T.; BURBACH, B.; SHIMIZU, Y.; ERVASTI, J.** 2011.  $\beta$ -Actin specifically controls cell growth migration, and the G-actin pool. *Mol. Biol. Cell.* 22:4047-4058.

**BUSTIN, S.** 2000. Review. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25:169-226.

**BUSTIN, S.** 2002. Invited review. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* 29:23-39.

**BUSTIN, S.; BENES, V.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.** 2005. Review: Quantitative real-time RT-PCR - a perspective. *J. Mol. Endocrinol.* 34:597-601.

**BUSTIN, S.; BENES, V.; GARSON, J.; HELLEEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLES, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.; SHIPLEY, G.; VANDESOMPELE, J.; WITWER, C.** 2009. The MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* 55(4): 611-622.

**CARNEVALI, O.; CARLETTA, R.; CAMBI, A.; VITA, A.; BROMAGE, N.** 1999a. Yolk formation and degradation during oocyte maturation in seabream *Sparus aurata*: involvement of two lysosomal proteinases. *Biol. Reprod.* 60 (1): 140-146.

**CARNEVALI, O.; CENTONZE, F.; BROOKS, S.; MAROTA, I.; SUMPTER, J.** 1999b. Molecular cloning and expression of ovarian cathepsin D in seabream, *Sparus aurata*. *Biol. Reprod.* 61:785-791.

**CARNEVALI, 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.* 202: 249-256.

**CARNEVALI, O.; CIONNA, C.; TOSTI, L.; LUBZENS, E.; MARADONNA, F.** 2006. Review role of cathepsins in ovarian follicle growth and maturation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 146: 195-203.

**CARNEVALI, O.; CIONNA, C.; TOSTI, L.; CERDÀ, J.; GIOACCHINI, G.** 2008. Changes in cathepsin gene expression and relative enzymatic activity during Gilthead Sea Bream oogenesis. *Mol. Reprod. Dev.* 75: 97-104.

**CERDÀ, J.** 2009. Mecanismos moleculares durante la maduración y ovulación del oocito de teleosteos: avances recientes y su aplicación en acuicultura. **In:** Carrillo, M.; Muñoz, J.; Zanuy, S.; Rocha, A.; Molés, G.; Bayarri, M.; Piferrer, F.; Fernández- Palacios, H.; Izquierdo, M.; Cerdà, J.; Herráez, M.; Navas, J.; Cañavate, J.; López, V.; Valdebenito, I. La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura. Fundación observatorio español de acuicultura, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Ministerio de Medio Ambiente y Medio rural y Marino. Madrid, España. pp:401-474.

**COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA (CONICYT).** 2010. Programa de Diversificación de la Acuicultura Chilena, PDACH. [en línea]. **In:** Fondo de Fomento al Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDEF). <<http://www.conicyt.cl/fondef/files/downloads/2012/09/PDACH090310.pdf>> [consulta: 15-04-2013].

**DEVLIN, R.; NAGAHAMA, Y.** 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*. 208(3): 191-364.

**FABRA, M.; RALDÚA, D.; BOZZO, M.; DEEN, P.; LUBZENS, E.; CERDÀ, J.** 2006. Yolk proteolysis and aquaporin-10 play essential roles to regulate fish hydration during meiosis resumption. *Dev. Biol.* 295: 250-262.

**FERNANDES, J.; MOMMENS, M.; HAGEN, O.; BABIAK, I.; SOLBERG, C.** 2008. Selection of suitable reference genes for real-time PCR studies of Atlantic halibut development. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 150: 23-32. ok

**FERNÁNDEZ, C.; ROUFIDOU, CH.; ANTONOPOULOU, E.; SARROPOULOU, E.** 2013. Expression of development-stage-specific genes in the Gilthead Sea Bream *Sparus aurata* L. *Mar. Biotechnol.* 15: 313-320.

**FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO).** 2013. Aquaculture topics and activities. *Acuicultura*. [en línea]. **In:** Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. <<http://www.fao.org/fishery/aquaculture/es>> [consulta: 15-04-2013].

**HIRAMATSU, N.; HARA, A.; HIRAMATSU, K.; FUKADA, H.; WEBER, GM.; DENSLOW, ND, SULLIVAN, CV.** 2002a. Vitellogenin-derived yolk proteins of white perch, *Morene americana*: Purification, characterization, and vitellogenin- receptor binding. *Biol. Reprod.* 67:655-667.

**HIRAMATSU, N.; MATSUBARA, T.; HARA, A.; DONATO, DM.; HIRAMATSU, K.; DENSLOW, ND; SULLIVAN, CV.** 2002b. Identification, purification and classification of multiple forms of vitellogenin from white perch (*Morone americanana*). *Biol. Physiol. Biochem.* 26:355-370.

**HIRAMATSU, N.; MATSUBARA, T.; WEBER, GM.; SULLIVAN, CV.; HARA, A.** 2002c. Vitellogenesis in aquatic animals. *Fish. Sci.* 68: 694-699.

**JIA, A.; ZHANG, X.** 2009. Molecular cloning, characterization and expression analysis of cathepsin D gene from turbot *Scophthalmus maximus*. *Fish Shellfish Immunol.* 26(4):606-6013.

- KANE, D.; KIMMEL, C.** 1993. The zebrafish midblastula transition. *Development*. 119:447-456.
- 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*). *Biol. Reprod.* 65: 1701–1709.
- McCLELLAND, G; CRAIG, P.; DHEKNEY, K; DIPARDO, S.** 2006. Temperature- and exercise- induced gene expression and metabolic enzyme changes in skeletal muscle of adult zebrafish (*Danio rerio*). *J. Physiol.* 577: 739-751.
- MORAN, D.; SMITH, C.; GARA, B.; POORTENAAR, C.** 2007a. Reproductive behavior and early development in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi* Valenciennes 1833). *Aquaculture*. 262: 95-104.
- MORAN, D.; GARA, B.; WELLS, R.** 2007b. Energetics and metabolism of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi* Valenciennes 1833) during embryogenesis. *Aquaculture*. 265:359-369.
- NAGAHAMA, Y.; YAMASHITA, M.** 2008. Review regulation of oocyte maturation in fish. *Develop. Growth Differ.* 50:S195- S219.
- NEWPORT, J.; KIRSCHNER, M.** 1982. A major developmental transition in early xenopus embryos: I. characterization and timing of cellular changes at the misblastula stage. *Cell*. 30(3): 675-686.
- PFAFFL, M.** 2004. Quantification strategies in real-time PCR. **In:** A-Z of quantitative PCR. Praderas. International University Line. La Jolla, CA, Chile. pp. 87-112.
- PFAFFL, M; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C.; NEUVIANS, T.** 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlation. *Biotechnol. Lett.* 26:509-515.
- POORTENAAR, C.; HOOKER, S.; SHARP, N.** 2001. Assessment of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi lalandi*) reproductive physiology, as a basis for aquaculture development. *Aquaculture*. 201: 271-286.
- SAWAGUCHI, S.; KAGAWA, H.; OHKUBO, N.; HIRAMATSU, N.; SULLIVAN, CG.; MATSUBARA, T.** 2006. Molecular Characterization of three forms of vitellogenin and their yolk protein products during oocyte growth and maturation in Sea Seabream (*Pagrus major*), a marine teleost spawning pelagic eggs. *Mol. Reprod. Dev.* 73: 719-736.
- SERVICIO NACIONAL DE PESCA (SERNAPECA).** 2012. Chile, cosecha de centros de acuicultura año 2011 por especie y región. [en línea]. **In:** Anuarios 2011. Cosechas por región. [http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com\\_remository&Itemid=246&func=startdo wn&id=6307](http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_remository&Itemid=246&func=startdo wn&id=6307) > [consulta: 15-04-2013].
- SOLANAS, M.; MORAL, R.; ESCRICH, E.** 2001. Unsuitability of using ribosomal RNA as loading control for Northern blot analyses related to the imbalance between messenger and ribosomal RNA content in rat mammary tumors. *Anal. Biochem.* 288:99-102.

- SOLNICA-KREZEL, L.; DRIEVER, W.** 1994. Microtubule arrays of the zebrafish yolk cell: organization and function during epiboly. *Development*. 120:2443-2455.
- TANG, R.; DODD, A.; LAI, D.; MCNABB, W.; LOVE, D.** 2007. Validation of zebrafish (*Danio rerio*) reference genes for quantitative real-time RT-PCR Normalization. *Acta Bioch. Bioph. Sin.* 39(5): 384-390.
- THELLIN, O.; ZORZI, W.; LAKAYE, B.; DE BORMAN, B.; COUMANS, B.; HENNEN, G.; GRISAR, T.; IGOUT, A.; HEINEN, E.** 1999. Short communication. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J. Biotechnol.* 75:291-295.
- VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F.** 2002. Research. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3(7): research0034.
- WARNER, JR.** 1999. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem. Sci.* 24: 437-440.
- WONG, M.; MEDRANO, J.** 2005. Review. Real-time for mRNA quantification. *Biotechniques.* 39: 75-85.
- ZHAO, H.; STET R.; SKJODT, K.; SVELKOU, H.** 2008. Expression and characterization of recombinant single-chain salmon class I MHC fused with beta2-microglobulin with biological activity. *Fish Shellfish Immunol.* 24(4):459-466.
- ZHONG, Q.; ZHANG, Q.; WANG, Z.; QI, J.; CHEN, Y.; LI, S.; SUN, Y.; LI, C.; LAN, X.** 2008. Expression profiling and validation of potential reference genes during *Paralichthys olivaceus* embryogenesis. *Mar. Biotechnol.* 10: 310-318.

## ANEXOS

Anexo 1: Componentes y cantidades por reacción del kit Maxima SYBR Gree/Fluorescein qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific).

Componente	Cantidad por reacción
Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2X)*	6,25 µL
Partidor Forward	0,2-0,4-0,6 µM según cada partidor
Partidor Reverse	0,2-0,4-0,6 µM según cada partidor
Templado o cDNA	10 ng excepto en las curvas de eficiencia
Agua DEPC	Hasta completar un volumen total de 12,5 µL

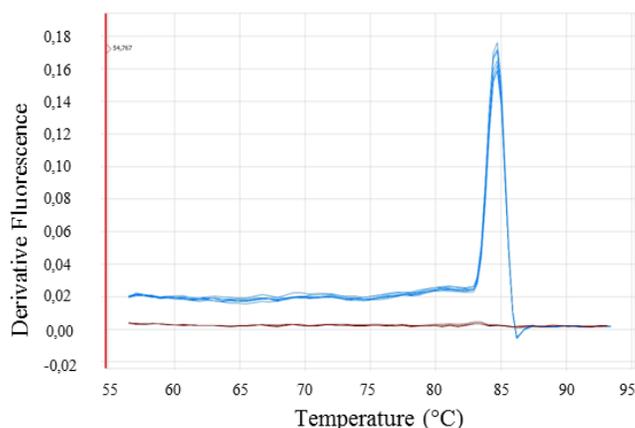
\*Incluye la DNA polimerasa *Taq* Maxima®Hot Start (enzima termoestable que replica DNA), dNTPs, SYBR®Green I (colorante intercalante para detectar DNA de doble hebra) y fluoresceína (colorante pasivo de referencia).

Anexo 2: Perfil término usado en los qPCR.

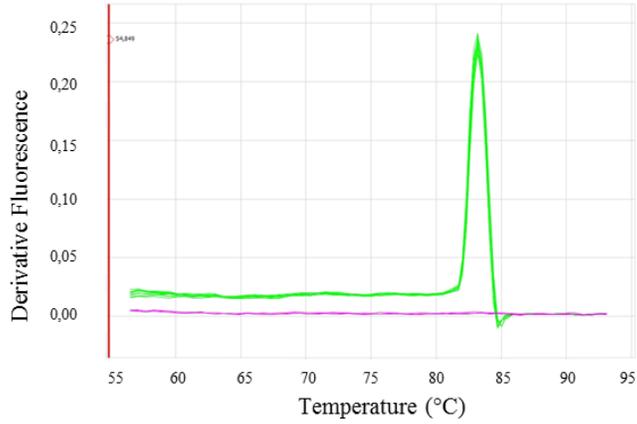
Fase	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Denaturación inicial	50°C	2 minutos	1
Denaturación	95°C	15 segundos	40
Alineación	T <sub>m</sub> de partidores	30 segundos	
Extensión	72°C	30 segundos	
	95°C	15 segundos	
Curva de fusión*	T <sub>m</sub> de partidores	15 segundos	1
	95°C	15 segundos	

\*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.

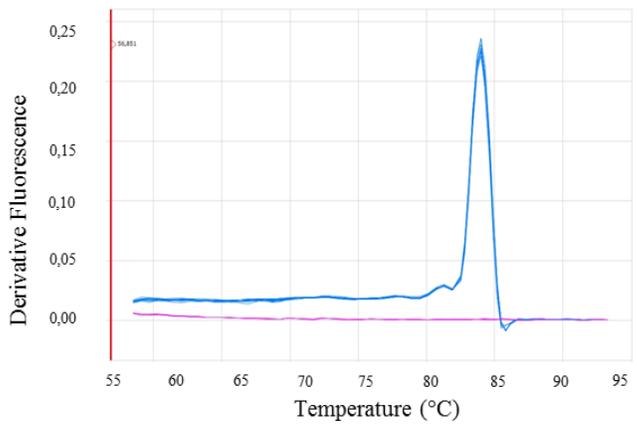
Anexo 3: Curvas de Fusión de los genes de referencia y de los genes objetivos (catepsinas).



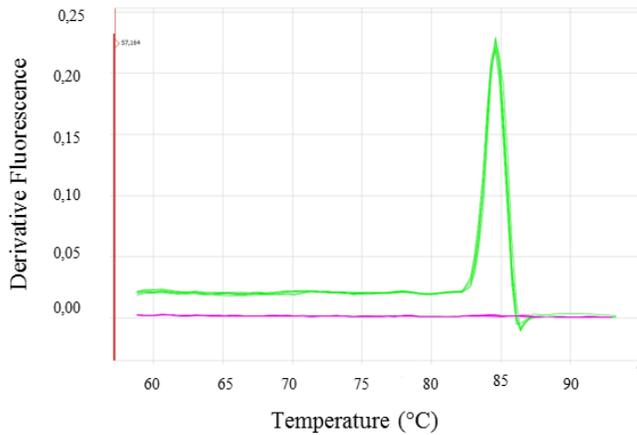
Curva de Fusión de EF-1 $\alpha$ , con un único peak en 84,7 °C, la línea roja representa el blanco sin templado con ausencia de amplificación.



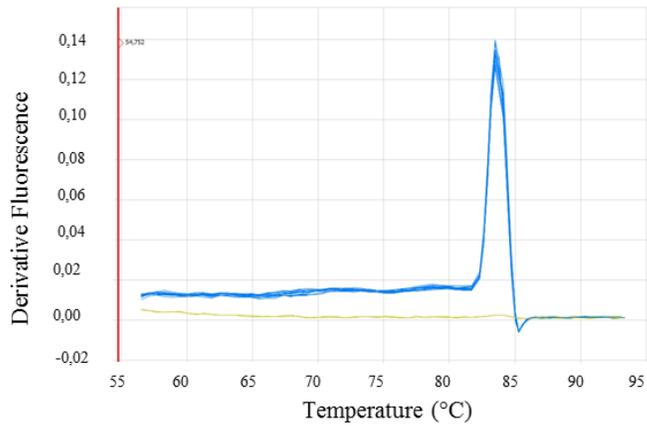
Curva de Fusión de GAPDH, con un único peak en 83,2 °C, la línea rosada representa el blanco sin templado con ausencia de amplificación.



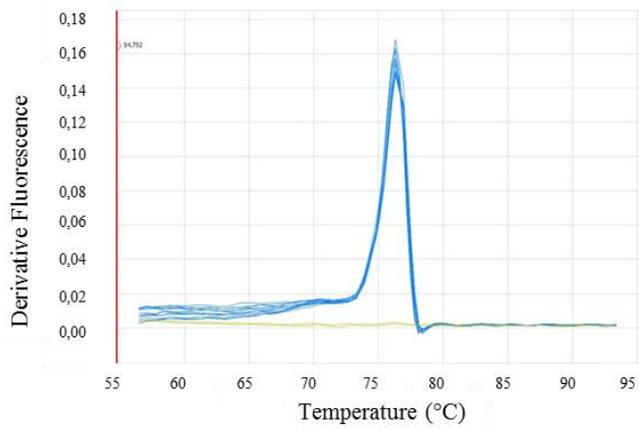
Curva de Fusión de 18S, con un único peak en 84 °C, la línea rosada representa el blanco sin templado con ausencia de amplificación.



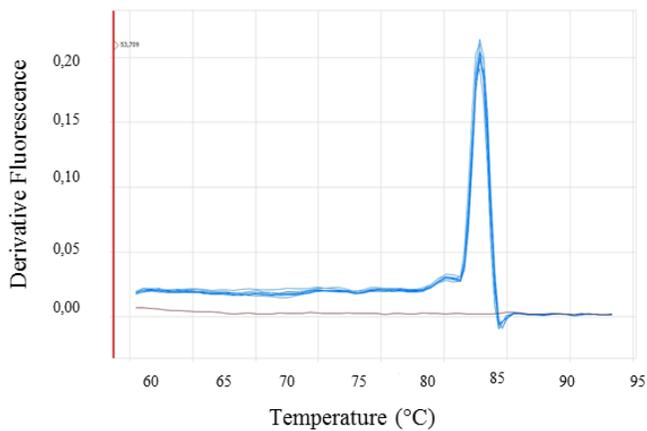
Curva de Fusión de ACTB, con un único peak en 84,6 °C, la línea rosada representa el blanco sin templado con ausencia de amplificación.



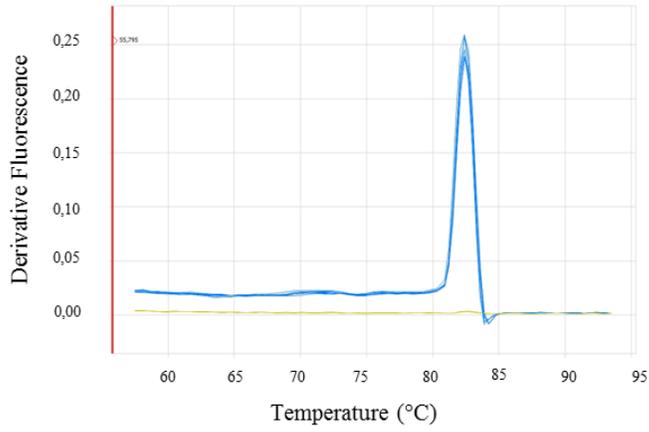
Curva de Fusión de TUB, con un único peak en 83,5 °C, la línea amarilla representa el blanco sin templado con ausencia de amplificación.



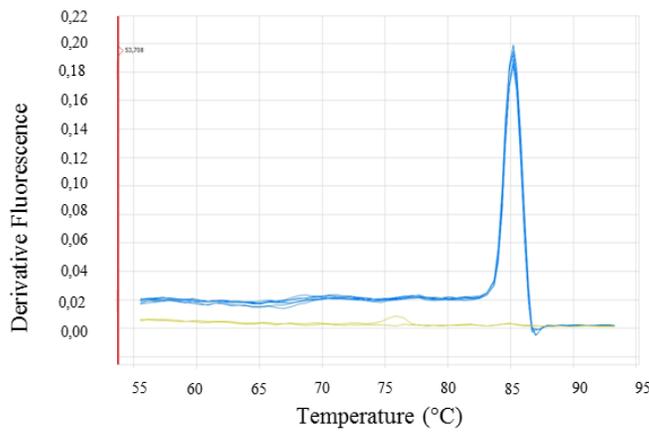
Curva de Fusión de B2MIC, con un único peak en 76,3 °C, la línea amarilla representa el blanco sin templado con ausencia de amplificación.



Curva de Fusión de cathepsina B, con un único peak en 82,8 °C, la línea roja representa el blanco sin templado con ausencia de amplificación.

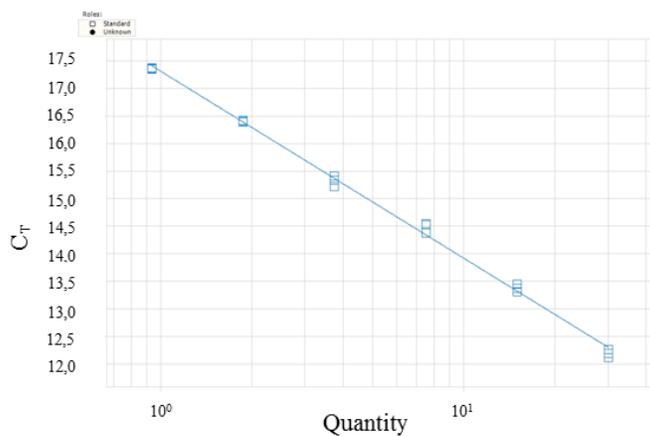


Curva de Fusión de catepsina D, con un único peak en 82,4 °C, la línea amarilla representa el blanco sin templado con ausencia de amplificación.

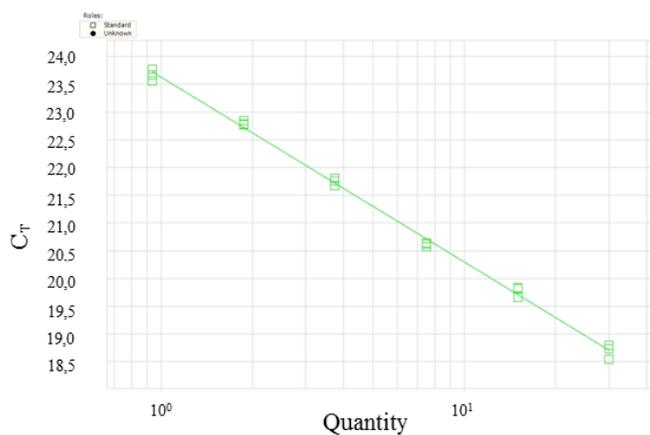


Curva de Fusión de catepsina L, con un único peak en 85,2 °C, la línea amarilla representa el blanco sin templado con ausencia de amplificación.

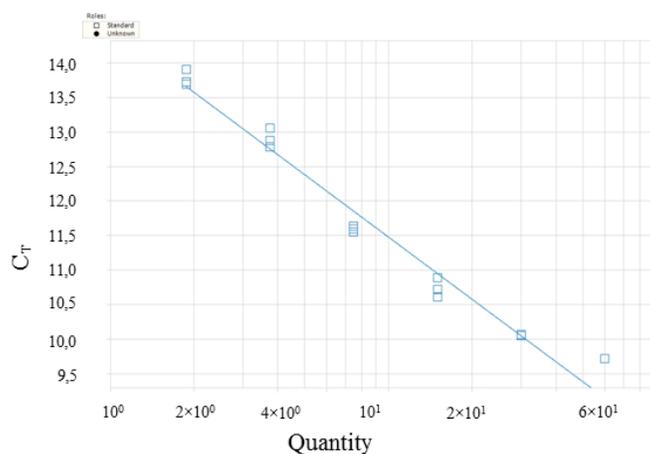
Anexo 4: Curvas estándar de los genes de referencia y de los genes objetivos (catepsinas).



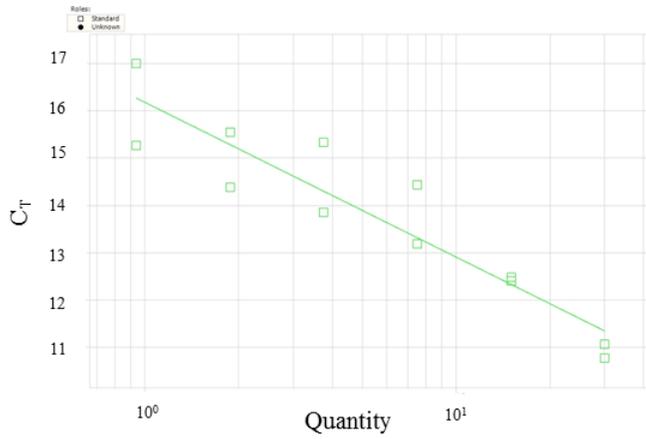
Curva estándar EF-1 $\alpha$   
 Pendiente:  $-3,398$ ; Intersección Y:  $17,32$ ;  
 Eficiencia:  $96,91\%$ ;  $R^2$ :  $0,997$



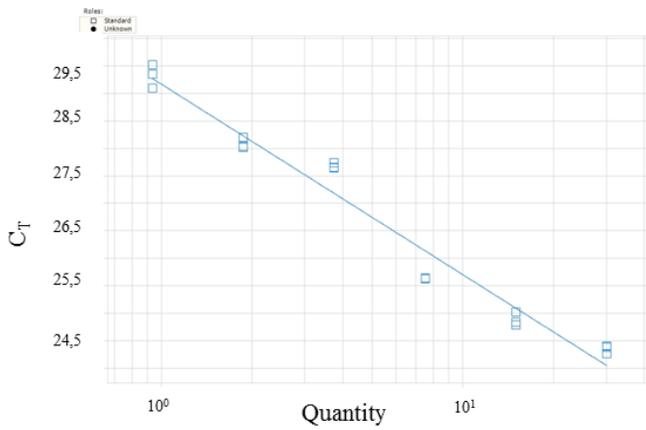
Curva estándar GAPDH  
 Pendiente:  $-3,330$ ; Intersección Y:  $23,63$ ;  
 Eficiencia:  $99,68\%$ ;  $R^2$ :  $0,997$



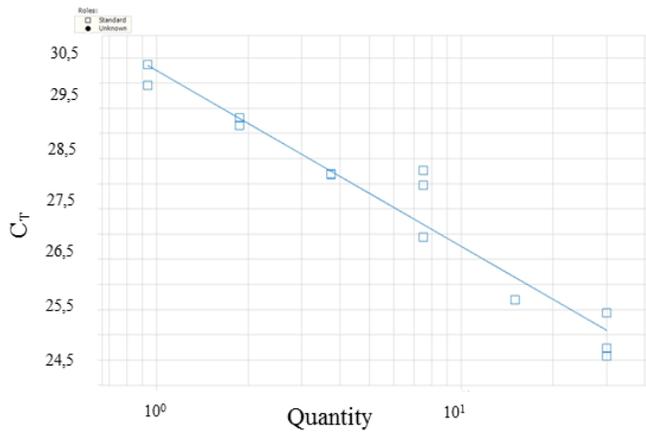
Curva estándar 18S  
 Pendiente:  $-2,995$ ; Intersección Y:  $14,48$ ;  
 Eficiencia:  $115,70\%$ ;  $R^2$ :  $0,993$



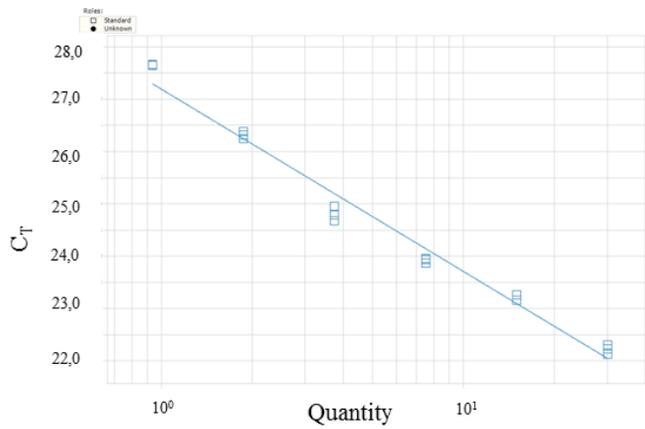
Curva estándar ACTB  
 Pendiente:  $-3,273$ ; Intersección Y:  $16,18$ ;  
 Eficiencia:  $102,09\%$ ;  $R^2$ :  $0,863$



Curva estándar TUB  
 Pendiente:  $-3,469$ ; Intersección Y:  $29,17$ ;  
 Eficiencia:  $94,19\%$ ;  $R^2$ :  $0,964$

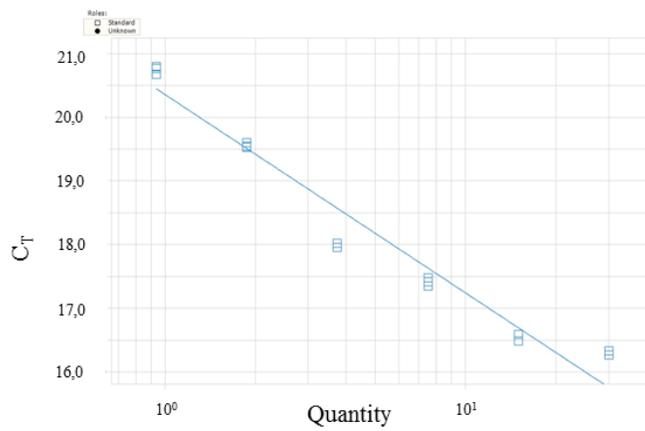


Curva estándar B2MIC  
 Pendiente:  $-3,298$ ; Intersección Y:  $30,27$ ;  
 Eficiencia:  $101\%$ ;  $R^2$ :  $0,845$



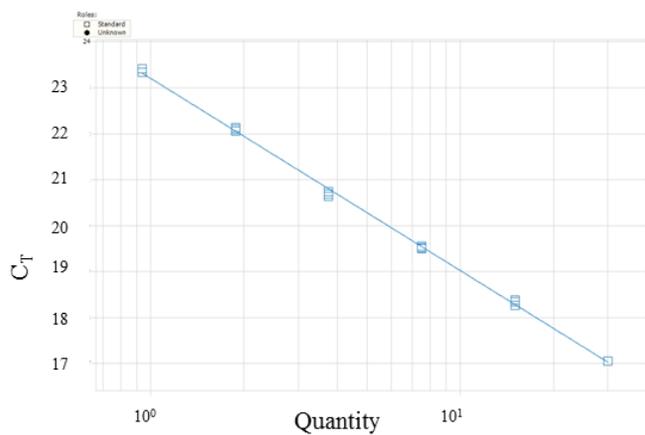
Curva estándar catepsina B

Pendiente:  $-3,484$ ; Intersección Y:  $27,19$ ;  
 Eficiencia:  $93,65\%$ ;  $R^2: 0,979$



Curva estándar catepsina D

Pendiente:  $-3,113$ ; Intersección Y:  $20,36$ ;  
 Eficiencia:  $109,51\%$ ;  $R^2: 0,955$



Curva estándar catepsina L

Pendiente:  $-4,176$ ; Intersección Y:  $23,20$ ;  
 Eficiencia:  $73,55\%$ ;  $R^2: 0,999$