



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

**EXPRESIÓN DE ARNs MENSAJEROS DE GENES APOPTÓTICOS
(BAX, CASPASA-9, CASPASA-3 y BCL-2) EN EMBRIONES
TEMPRANOS DE *Seriola lalandi* CON DIFERENTE NIVEL DE
FLOTALIDAD**

Camila Alejandra Gómez Pérez

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

PROFESOR GUÍA: JAIME ALFREDO PALOMINO MACKENNEY

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

Proyecto FONDECYT 11140639

SANTIAGO, CHILE

2018



**EXPRESIÓN DE ARNs MENSAJEROS DE GENES APOPTÓTICOS
(BAX, CASPASA-9, CASPASA-3 y BCL-2) EN EMBRIONES
TEMPRANOS DE *Seriola lalandi* CON DIFERENTE NIVEL DE
FLOTALIDAD**

Camila Alejandra Gómez Pérez

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

Nota Final:

Profesor Guía: Dr. Jaime Palomino M.

Profesor Corrector: Dr. Víctor Martínez M.

Profesor Corrector: Dr. Óscar Peralta T.

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

Proyecto FONDECYT 11140639

SANTIAGO, CHILE

2018

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

Esta memoria de título va dedicada a mi familia, quienes me han acompañado en cada etapa de mi vida. En especial, quiero agradecer a mi tía Arcadia y a mi tía Soledad por sus valores, preocupación, compañía y apoyo incondicional que me han brindado durante mi desarrollo personal y profesional. Gracias por ser un pilar fundamental en todo lo que soy, espero siempre entregarles dicha y orgullo. Gracias por creer en mí.

Agradezco también, al Doctor Jaime Palomino por su confianza, paciencia y buena voluntad para instruirme en la investigación científica y al laboratorio de Reproducción Animal de FAVET e INBIOGEN por su cooperación en la realización de este trabajo.

Finalmente, quiero agradecer a las amistades que fui forjando durante mi vida universitaria, haciendo que esta experiencia fuera totalmente enriquecedora en todo ámbito de mi vida.

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

ÍNDICE DE CAPÍTULOS	1
ÍNDICE DE TABLAS	3
ÍNDICE DE FIGURAS	4
RESUMEN	5
SUMMARY	6
INTRODUCCIÓN	7
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	8
1. Características generales de <i>Seriola lalandi</i>	8
2. Ovogénesis: crecimiento y maduración del ovocito en peces teleósteos	8
3. Flotabilidad de los huevos y embriones de peces pelágicos	9
4. Apoptosis: mecanismos de regulación y su relación con la flotabilidad de los huevos	10
HIPÓTESIS	12
OBJETIVO GENERAL	12
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
MATERIALES Y MÉTODOS	13
1. Obtención de las muestras	13
2. Extracción de ARN y transcripción reversa	13
3. Diseño y evaluación de partidores	14
4. qPCR y cálculo de expresión relativa	16
5. Expresión de genes constitutivos	16

6. Análisis estadístico	17
RESULTADOS	18
1. Expresión relativa de Bax	18
2. Expresión relativa de Caspasa-9	19
3. Expresión relativa de Caspasa-3	19
4. Expresión relativa de Bcl-2	20
5. Expresión de genes constitutivos	21
DISCUSIÓN	23
CONCLUSIÓN	27
BIBLIOGRAFÍA	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1: Función, secuencia, Tm, concentración y eficiencia de los partidores para los genes constitutivos.	15
Tabla N°2: Secuencia, Tm, concentración y eficiencia de los partidores para los genes objetivos.	15

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°1: Expresión relativa de Bax en 5 etapas del desarrollo embrionario temprano de <i>S. lalandi</i> de acuerdo con su nivel de flotabilidad.	18
Figura N°2: Expresión relativa de Caspasa-9 en 5 etapas del desarrollo embrionario temprano de <i>S. lalandi</i> de acuerdo con su nivel de flotabilidad.	19
Figura N°3: Expresión relativa de Caspasa-3 en 5 etapas del desarrollo embrionario temprano de <i>S. lalandi</i> de acuerdo con su nivel de flotabilidad.	20
Figura N°4: Expresión relativa de Bcl-2 en 5 etapas del desarrollo embrionario temprano de <i>S. lalandi</i> de acuerdo con su nivel de flotabilidad.	21
Figura N°5: Valores de Ct de ACT β en 5 etapas del desarrollo embrionario temprano de <i>S. lalandi</i> de acuerdo con su nivel de flotabilidad.	21
Figura N°6: Valores de Ct de MAP 1 β en 5 etapas del desarrollo embrionario temprano de <i>S. lalandi</i> de acuerdo con su nivel de flotabilidad.	22
Figura N°7: Valores de Ct de GAPDH en 5 etapas del desarrollo embrionario temprano de <i>S. lalandi</i> de acuerdo con su nivel de flotabilidad.	22
Figura N°8: Valores de Ct de 18S en 5 etapas del desarrollo embrionario temprano de <i>S. lalandi</i> de acuerdo con su nivel de flotabilidad.	22

RESUMEN

La flotabilidad de los embriones tempranos de peces pelágicos se asocia a la calidad y sobrevivencia de éstos. En cautiverio se ha observado una alta mortalidad embrionaria que se ha relacionado con la pérdida de flotabilidad de los huevos, proponiéndose la participación de mecanismos apoptóticos. El objetivo de este estudio fue evaluar la expresión de genes relacionados con la apoptosis celular durante el desarrollo embrionario temprano de *Seriola lalandi* y su relación con el nivel de flotabilidad. Para esto, se evaluó mediante RT-qPCR la expresión relativa de Bax, Caspasa-9, Caspasa-3 y Bcl-2 en cinco estadios del desarrollo previamente clasificados como embriones flotantes y no flotantes. Se observó una mayor expresión de Bax en embriones no flotantes, la cual aumentó significativamente hasta este estadio de gástrula. Caspasa-9 presentó niveles estables de expresión en las muestras flotantes hasta gástrula. En blástulas no flotantes se presentó la mayor expresión de este gen, la cual fue estadísticamente superior a la encontrada en blástulas flotantes. En blástulas y gástrulas, Caspasa-3 presentó mayor expresión en muestras no flotantes. La mayor expresión de los factores pro-apoptóticos Bax, Caspasa-9 y Caspasa-3 en algunos embriones no flotantes de *S. lalandi*, permitirían relacionar la pérdida de flotabilidad de estos embriones con la participación de mecanismos de apoptosis celular. Por otro lado, la expresión de ARNm que codifica para Bcl-2 no presentó diferencias entre embriones flotantes y no flotantes, lo que sugiere la participación de este factor anti-apoptótico como protector de la viabilidad celular del embrión a través del desarrollo.

SUMMARY

The buoyancy of the early embryos in pelagic fish is associated with its quality and survival. High mortality of early embryos in captivity conditions has been associated with the loss of buoyancy of the eggs, where apoptotic mechanisms have been proposed. Therefore, the aim of this study was to evaluate the expression of genes related to the apoptosis process during the early embryonic development of *Seriola lalandi* and its relationship with the buoyancy level of the embryos. For this, the relative expression of Bax, Caspase-9, Caspase-3 and Bcl-2 was evaluated by RT-qPCR in five development stages, previously classified as floating and non-floating ones. High Bax expression levels was observed in non-floating embryos, which increased significantly until gastrula stage. Caspase-9 showed stable expression levels in floating samples up to gastrula. In non-floating samples, the highest expression of this gene was observed at blastula stage, which was higher than floating blastulae. At both blastula and gastrula stage, Caspase-3 showed higher expression in non-floating samples. The higher expression of the pro-apoptotic factors Bax, Caspase-9 and Caspase-3 in some non-floating embryos of *S. lalandi* would allow us to relate the low buoyancy of these embryos with the participation of cellular apoptosis mechanisms. On the other hand, the expression of mRNA encoding Bcl-2 does not present differences between floating and non-floating embryos, suggesting the participation of this anti-apoptotic factor as a protector of the cellular viability of the embryo through development.

INTRODUCCIÓN

Según cifras del Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (Sernapesca), en el año 2013 la producción pesquera total de Chile alcanzó los 3,3 millones de toneladas, de las cuales el 32% correspondió a cosechas acuícolas. Bajo los fundamentos de que esta producción se centra en un 95% en la producción de salmónidos y que, principalmente, se concentra en la X y XI región, es que CONICYT, CORFO y la División de Innovación de la Subsecretaría de Economía, han impulsado los Programas de Diversificación de la Acuicultura Chilena (PDACH). Esto, con el objetivo de incrementar el desarrollo de otras especies con potencial productivo y de exportación, dentro de las cuales se encuentra el pez *Seriola lalandi*.

S. lalandi es un pez pelágico marino con una tasa de crecimiento rápida, de buena calidad de carne y con una demanda creciente en todo el mundo (Poortenaar *et al.*, 2001). Estas características hacen que esta especie sea un buen candidato para la producción acuícola. Sin embargo, su producción en centros de cultivos se ha visto dificultada por una elevada mortalidad durante el período embrionario y larval (Morán *et al.*, 2007). Estudios desarrollados en otras especies pelágicas, proponen que esta mortalidad se debería, en parte, a la pérdida de flotabilidad que experimentarían los embriones en diferentes etapas del desarrollo temprano (Carnevali *et al.*, 2001b). En estas especies, la calidad y viabilidad de los embriones depende de la proporción de éstos que se mantienen flotando en la columna de agua, por lo que aquellos embriones que pierden flotabilidad están destinados a morir. Entre las causas que se han propuesto para explicar la muerte de los embriones no flotantes, se encuentra la participación de los mecanismos de apoptosis, los cuales estarían predeterminados desde que el ovocito se desarrolla en el ovario (Carnevali *et al.*, 2003; Thomé *et al.*, 2012).

En este estudio se evaluaron transcritos de factores apoptóticos (Bax, Caspasa-9, Caspasa-3 y Bcl-2) que podrían estar implicados con la pérdida de flotabilidad de los huevos y embriones tempranos en *S. lalandi*.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Características generales de *Seriola lalandi*

Seriola lalandi, es un pez de distribución mundial, cuya actividad acuícola se desarrolla principalmente en Japón, Australia y Nueva Zelanda y es dependiente de la captura de juveniles del medio natural (Moran *et al.*, 2007). Es un pez migratorio, que llega al norte de Chile como juvenil y adulto, especialmente entre las regiones de Antofagasta y 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 mencionan: 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). Por lo tanto, *S. lalandi* es un pez de buen valor de mercado que podría generar resultados en Chile a corto plazo debido a la experiencia y tecnología extranjera para su producción. Sin embargo, esta especie presenta una elevada mortalidad (95% de los huevos cultivados) durante el período embrionario y larval (Morán *et al.*, 2007), observándose esta situación en las empresas acuícolas del país, lo que dificulta su cultivo. Para buscar una solución a esta problemática, es importante saber cómo se lleva a cabo la ovogénesis y el desarrollo temprano de los embriones en estos peces, además de conocer las variables que podrían estar influyendo en la mortalidad de éstos.

2. Ovogénesis: crecimiento y maduración del ovocito en peces teleósteos

La ovogénesis en los peces se puede dividir en dos etapas: crecimiento y maduración de los ovocitos (Nagahama y Yamashita, 2008). El principal evento responsable del crecimiento del ovocito es el proceso denominado vitelogénesis, donde se acumulan las proteínas del vitelo (PVs) en el citoplasma (Fabra *et al.*, 2006). La hormona folículo estimulante (FSH) regula el crecimiento del ovocito y estimula la producción de esteroides en las células foliculares, las cuales producen estradiol, estimulando la producción hepática de una fosfoglicoproteína denominada vitelogenina (VTG) (Carnevali *et al.*, 2006). Las VTGs se transportan por el plasma sanguíneo hasta el ovario, donde son endocitadas por los ovocitos en crecimiento a través de vesículas mediadas por receptores específicos (Hiramatsu *et al.*,

2002). Estas vesículas, se fusionan con los lisosomas en el citoplasma cortical constituyendo los cuerpos multivesiculares, los cuales paulatinamente se organizan en gránulos o glóbulos del vitelo (Carnevali *et al.*, 2006). Las VTGs endocitadas, sufren una primera proteólisis limitada que resulta en las proteínas del vitelo (PVs) y que corresponden principalmente a lipovitelinas de cadena pesada y liviana (Hiramatsu *et al.*, 2002). Durante la etapa de maduración, las PVs experimentan una proteólisis que resulta fundamental para que se generen las condiciones osmóticas que favorecen la hidratación, en donde el huevo adquiere una flotabilidad positiva. Además, este proceso favorece la fecundación y es fundamental para la nutrición del embrión en desarrollo (Carnevali *et al.*, 2001 b). La proteólisis del vitelo en los teleósteos es llevada a cabo, principalmente, por las cisteíno- proteasas: catepsinas B y L y la aspártico-proteasa: catepsina D (Carnevali *et al.*, 2006).

3. Flotabilidad de los huevos y embriones de peces pelágicos

El 67-75 % del volumen final del huevo de teleósteos se alcanza previo a la ovulación durante el proceso de hidratación (Cerde, 2002). De acuerdo con esto, los huevos de los peces teleósteos pueden clasificarse en demersales, con una hidratación y flotabilidad nula o muy reducida, y en huevos pelágicos, con un gran contenido en agua y una flotabilidad positiva (Cerde, 2002). En las especies pelágicas, los principales efectores osmóticos de la hidratación son los aminoácidos libres (AALs) derivados de la proteólisis de las PVs, ya que, al aumentar la concentración de éstos, se favorece el ingreso de agua en los ovocitos maduros (Fabra *et al.*, 2006). Por lo tanto, la supervivencia de los huevos y embriones en especies pelágicas depende del nivel de flotabilidad que éstos adquieren, lo cual, a su vez, representa la acumulación y procesamiento de los componentes citoplasmáticos (Carnevali *et al.*, 2001b; Fabra *et al.*, 2006; Moran *et al.*, 2007). La pérdida de flotabilidad se ha relacionado directamente con las altas tasas de mortalidad observadas en embriones tempranos de estas especies. Esta situación, se ha atribuido principalmente a factores relacionados con la mantención en cautiverio de los reproductores, tanto a factores bióticos como abióticos propios de su cultivo (Thomé *et al.*, 2012). Sin embargo, también se ha propuesto que la muerte de los huevos que no adquieren un nivel adecuado de flotabilidad podría estar predeterminada desde que el ovocito se está formando en el ovario, lo que implicaría la participación de mecanismos apoptóticos (Carnevali *et al.*, 2003; Thomé *et al.*, 2012).

4. Apoptosis: mecanismos de regulación y su relación con la flotabilidad de los huevos

La apoptosis es un proceso programado de las células para morir después de recibir estímulos específicos, donde ocurren cambios bioquímicos y morfológicos, tales como: la formación de vesículas en la membrana, contracción celular, desorganización del citoesqueleto, fragmentación nuclear, condensación de cromatina y fragmentación del ácido desoxirribonucleico (ADN) (Rojas *et al.*, 2009). Estos cambios son provocados por la transmisión de señales mediadas por un grupo conservado de cisteín-proteasas denominadas caspasas, las cuales son sintetizadas en su forma inactiva: pro-caspasa, que al recibir la señal apoptogénica sufren un proceso proteolítico que da lugar a la enzima activa. La cascada de la apoptosis puede iniciarse por dos vías: extrínseca e intrínseca (Jayakiran, 2015). Ambas vías convergen en un punto común que inicia la vía final de la apoptosis. Las caspasas 3, 6 y 7 funcionan como caspasas efectoras, las cuales en última instancia causan los cambios morfológicos y bioquímicos observados en las células apoptóticas (Jayakiran, 2015). La vía extrínseca es iniciada por estímulos extracelulares que activan la unión de un ligando de muerte (FasL) a su receptor específico (Fas) en la superficie celular (Rojas *et al.*, 2009). Este complejo ligando-receptor recluta factores citosólicos como el dominio de muerte asociado a FAS (FADD) y a la caspasa-8, la cual hidroliza a un sitio específico de la pro-caspasa-3, activándola a Caspasa-3 (Rojas *et al.*, 2009).

Por otro lado, la vía intrínseca o mitocondrial se induce por el estrés extra o intracelular, lo que causa un aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa que conduce a la liberación de moléculas pro-apoptóticas como el citocromo c (Jayakiran, 2015). El citocromo c se une y activa a la proteína factor 1 activador de la proteasa apoptótica (Apaf-1), para que se una a un ATP y forme el apoptosoma, lo que conlleva a la activación autocatalítica de Caspasa-9, que a su vez activa a la Caspasa-3 (Rojas *et al.*, 2009). En esta vía, también participan la familia de proteínas de células β de linfoma (Bcl-2), las cuales regulan directamente la permeabilidad de la membrana mitocondrial, permitiendo o inhibiendo el flujo de proteínas apoptogénicas. Estas proteínas incluyen proteínas anti-apoptóticas como: Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bfl-1, Bcl-W y proteínas pro-apoptóticas como: Bax, Bak, Bok, Bim y Bid (Rojas *et al.*, 2009). Cuando Bax y Bak se activan, oligomerizan en la membrana mitocondrial, dando como resultado la liberación de citocromo c. Por el

contrario, las proteínas anti-apoptóticas, tales como Bcl-2 y Bcl-XL, bloquean la oligomerización de Bax y Bak, preservando la viabilidad celular (Rojas *et al.*, 2009).

En los peces teleósteos, la apoptosis se produce en el ovario y puede ser un factor importante en el control de la atresia folicular. Se ha evidenciado un deterioro en la foliculogénesis cuando los parámetros físico-químicos de las aguas son desfavorables, observándose una mayor incidencia de actividad apoptótica y de Caspasa-3 en aquellos ambientes (Thomé *et al.*, 2012). También, se ha visto que Bax tiene una expresión más intensa en folículos de 2 a 3 días post desove, existiendo una alta incidencia de la apoptosis luego del tercer día. Por el contrario, la expresión de Bcl-2 sería más intensa en folículos inmediatamente después del desove y empieza a disminuir al día 2 y 3 (Morais *et al.*, 2016). Además, en huevos de *Sparus aurata*, un pez desovador pelágico como *S. lalandi*, se ha propuesto la participación de mecanismos apoptóticos en la pérdida de flotabilidad. En esta especie, se ha hipotetizado que los huevos que se hunden tienen una capacidad de síntesis de proteínas y ARN más baja, lo que conlleva a que sean menos activos que los flotantes (Carnevali *et al.*, 2001b), presentando también características apoptóticas como contracción celular, participación del sistema FAS/FAS-L, fragmentación del ADN y aumento de volumen de las mitocondrias (Carnevali *et al.*, 2003).

Estas evidencias, indicarían que la pérdida de flotabilidad en los huevos y embriones tempranos de peces pelágicos podría estar relacionada con mecanismos apoptóticos durante el desarrollo embrionario temprano de estas especies. Por lo tanto, y con el fin de conocer aspectos moleculares involucrados en la pérdida de flotabilidad de los huevos y embriones tempranos de *S. lalandi*, en este trabajo se evaluó la expresión de genes involucrados en la apoptosis celular, comparando la expresión a través del desarrollo y entre muestras flotantes y no flotantes. Además, con el propósito de demostrar homogeneidad estructural y funcional entre embriones flotantes y no flotantes, se comparó la actividad transcripcional mediante análisis de expresión de 4 genes regularmente utilizados como genes constitutivos en estudios de expresión génica.

HIPÓTESIS

Los ARNs mensajeros que codifican para Bax, Caspasa-9, Caspasa-3 y Bcl-2 se expresan durante el desarrollo embrionario temprano de *Seriola lalandi*. Los niveles de expresión de los genes pro-apoptóticos: Bax, Caspasa-9 y Caspasa-3, serán mayores en los embriones no flotantes, mientras que el gen anti-apoptótico Bcl-2 tendrá una mayor expresión en los embriones flotantes.

OBJETIVO GENERAL

Determinar los niveles de expresión de ARNm de genes relacionados con la apoptosis celular en distintas etapas del desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi* de acuerdo con el nivel de flotabilidad.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la expresión relativa de los ARNm que codifican para Bax, Caspasa-9, Caspasa-3 y Bcl-2 en distintas etapas del desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi*.
2. Comparar la expresión relativa de los ARNm que codifican para Bax, Caspasa-9, Caspasa-3 y Bcl-2 entre embriones tempranos de *S. lalandi* flotantes y no flotantes.
3. Evaluar y comparar la expresión de beta actina (ACT β), proteína asociada a microtúbulo 1 β (MAP 1 β), Gliceraldehído- 3- fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y Subunidad ribosomal 18S (18S) entre embriones flotantes y no flotantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los animales utilizados en este proyecto y los procedimientos experimentales a realizar están acorde a las normas de los Comités de Bioética de La Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias (FAVET) y de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT).

1. Obtención de las muestras

Las muestras fueron proporcionadas por Acuino S.A, empresa ubicada en la ciudad de Caldera en la región de Atacama, Chile. Esta empresa, está dedicada a la producción en cautiverio de *S. lalandi*, contando con cuatro estanques de 85.000 litros de agua de mar filtrada con sistema de recirculación a 21°C, salinidad de 35 ppm y oxígeno al 100%, en donde se encuentran entre 18 y 25 reproductores en cada uno con manejo de fotoperiodo artificial para obtener desoves todo el año, siendo la proporción de hembras y macho de 1:3. Durante tres eventos de desove distintos, se colectaron aproximadamente 50 embriones en diferentes etapas del desarrollo embrionario, según lo descrito por Morán *et al.*, (2007). Estas etapas corresponden a: huevo (H), mórula temprana (M), blástula (B), gástrula (G) y embriones de 24 horas (E), identificados por microscopía. Las muestras fueron trasladadas desde el estanque a un frasco colector de forma cónica e invertido con una capacidad de 4 litros, donde permanecieron por 10 minutos. Las muestras flotantes fueron extraídas desde la superficie del colector utilizando una malla, mientras que los huevos y embriones con menor nivel de flotabilidad se colectaron desde el fondo del frasco, eliminando 1 Litro de agua a través de una llave. Las muestras se mantuvieron en RNAlater® *Solution* (Ambion®) para su transporte a 4°C hasta el laboratorio de Reproducción Animal de FAVET, donde se almacenaron a -20°C hasta su posterior uso.

2. Extracción de ARN y transcripción reversa

El ARN fue extraído a través de columnas de afinidad con el Kit de Purificación GeneJET™ RNA (Thermo) siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando un mortero cónico pequeño. La concentración de ARN total se cuantificó mediante fluorometría utilizando el Kit Qubit® RNA Assay (Molecular Probes® Invitrogen™) y 5 µL de la solución resultante

del paso anterior, a través del equipo Qubit® Fluorometer (Invitrogen™). Una vez realizada la cuantificación, las muestras se almacenaron a - 80°C.

Posteriormente, las muestras fueron procesadas para transcripción reversa (RT), donde se utilizó el conjugado enzimático SuperScript™ First- StrandSynthesisSystem (Invitrogen™), el cual incluye un tratamiento inicial con DNasa I. La concentración del ADN complementario (ADNc) se determinó utilizando el Kit de cuantificación Qubit® ssDNAAssary (Molecular Probes® Invitrogen™). El ADNc se almacenó a -20°.

3. Diseño y evaluación de partidores

Los partidores para Bax, Caspasa-9, Caspasa-3 y Bcl-2 se diseñaron en base a un transcriptoma de referencia de *S. lalandi*, obtenido a través de ensamblado *de novo* en el laboratorio Favet-INBIOGEN de la Universidad de Chile, Chile (Patel *et al.*, 2016). Se utilizó el software Primer 3Plus, considerando un porcentaje de Guanina y Citosina entre 45% y 55%, respectivamente, y una diferencia de temperatura en *Forward* y *Reverse* no mayor a 5°C con una longitud del partidador de 20 bp. Además, los partidores fueron evaluados a través de software NetPrimer, evitando la existencia de horquillas, dímeros y repeticiones de base. También, se utilizaron partidores para los genes constitutivos beta actina (ACT β) y proteína asociada a microtúbulo 1 β (MAP 1 β), los que fueron utilizados como referencia en la normalización de la expresión de los genes objetivos. La estabilidad de estos genes fue determinada previamente en el laboratorio mediante el programa Normfinder (Herrera, 2013; Palomino *et al.*, 2017). Además, se utilizaron partidores para genes constitutivos funcionales, tales como: Gliceraldehído- 3- fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y Subunidad ribosomal 18S (18S) con el fin de realizar una comparación de actividad transcripcional entre muestras flotantes y no flotantes.

Gen	Función	Secuencia <i>Forward</i> (F) 5'-3' Secuencia <i>Reverse</i> (R) 5'-3'	Tm*	Concentración	Eficiencia
ACT β	Componente del citoesqueleto y mediador de la motilidad celular	F: AGGAAATCGTGCGTGACAT R: GCTGAAGTTGTTGGGCGTTT	57°C	F: 0,2 μM R: 0,2 μM	2,04
MAP 1β	Proteína estructural del citoesqueleto	F: TCATCAAGATTATCAGGAGGCG R: GGAAGCATACACCATGTAGAGG	55°C	F: 0,6 μM R: 0,6 μM	1,88
GAPDH	Glicólisis	F: CCCTTCATCGACCTGGAGTA R: GAGCAGAGGCCTTCTCAATG	55°C	F: 0,6μM; R: 0,4μM	1,99
18S	Constituyente de la subunidad ribosomal menor	F: GCTCGTAGTTGGATCTCGGG R: GGTGAGGTTTCCCGTGTGA	57°C	F: 0,4μM; R: 0,6μM	2,31

Tabla N°1: Función, secuencia, Tm, concentración y eficiencia de los partidores para los genes constitutivos (Herrera, 2013; Palomino *et al.*, 2017).

*Tm: promedio de las Tm de *Foward* y *Reverse*.

Posteriormente, se evaluaron tres juegos de partidores para Bax, Caspasa-9, Caspasa-3 y Bcl-2 mediante PCR tiempo real (RT-qPCR), a través de una matriz de partidores con distintas concentraciones de *Foward* y *Reverse*, utilizando una concentración constante de templado. Se evaluaron las Curvas de Melt (Tm), donde se observó un claro y único *peak*, similar a lo que se espera en base a la secuencia del amplicón y se eligió el juego de partidores con menor desviación estándar y con el menor número de ciclos umbrales (Ct). Una vez escogido el juego de partidores, se realizó una curva de calibración con distintas concentraciones de ADNc, partiendo con una concentración de 10 ng de ADNc y diluyendo en las siguientes proporciones: 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16.

Gen	Secuencia <i>Forward</i> (F) 5'-3' Secuencia <i>Reverse</i> (R) 5'-3'	Tm*	Concentración	Eficiencia
Bax	F: GGTGGAACAACCTGCTCAAGA R: TGCATGAAGATGTCCTGAGC	60°C	F: 0,4 μM R: 0,6 μM	2
Cas-9	F: GTCCCATGTGACAGCATGAT R: GAGAAGATTCAAGGCGCTCA	60°C	F: 0,4 μM R: 0,6 μM	1,99
Cas-3	F: CTTGTGGTTCACTCGTGTC R: ATACTATGACCGGGTCCCTGG	61°C	F: 0,6 μM R: 0,6 μM	2,08
Bcl-2	F: CAAGGAGGAGATGACATCGC R: TCCAGCTGTAAAGAGGTCCA	61°C	F: 0,6 μM R: 0,6 μM	1,99

Tabla N°2: Secuencia, Tm, concentración y eficiencia de los partidores para los genes objetivos.

*Tm: promedio de las Tm de *Foward* y *Reverse*.

4. qPCR y cálculo de expresión relativa

Las amplificaciones fueron realizadas en triplicado con un termociclador Illumina® Eco Real Time PCR System Model EC-100-1001 utilizando el Kit Máxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2X) (Thermo). Cada 12,5 µL de reacción contiene: 6,25 µL de Máxima SYBR Green/ Fluoresceína qPCR Master Mix (2X), un volumen de 0,2-0,6 µM de cada partidor, un volumen con 10 ng de ADNc y el volumen diferencial fue completado con agua DEPC hasta alcanzar los 12,5 µL. Las soluciones fueron puestas en el termociclador, según las condiciones del fabricante presentadas en la Tabla N°3.

Se evaluó la expresión relativa de Bax, Caspasa-9, Caspasa-3 y Bcl-2 en huevos y embriones tempranos de *S. lalandi* flotantes y no flotantes, registrando los niveles de expresión génica como valores Ct. Los valores Cts promedios de cada replica biológica fueron calculados y transformados en valores relativos denominados *Quantity(Q)* a través del Método $\Delta\Delta Ct$ (Vandesompele *et al.*, 2002; Pfaffl, 2004), mediante la siguiente formula:

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

Luego, la cuantificación de la expresión relativa de Bax, Caspasa-9, Caspasa-3 y Bcl-2, en cada etapa del desarrollo, fue estimada como el cociente entre el valor Q del gen analizado y el Factor de Normalización (FN), el cual se calculó en base a la medida geométrica de los Q de los genes de referencia. Cada qPCR se realizó con controles sin templado y sin partidores.

5. Expresión de genes constitutivos

Se realizaron tres replicas técnicas de qPCR con triplicado para evaluar la expresión de ACT β , MAP 1 β , GAPDH y 18S en embriones flotantes y no flotantes con el objetivo de corroborar de forma indirecta la viabilidad funcional de estos. Se comparó la expresión de ARNm de los genes mediante los valores de Ct obtenidos en las 5 etapas del desarrollo embrionario de *S. lalandi*.

6. Análisis estadístico

Se evaluaron 3 réplicas biológicas correspondientes a ARN extraído de 3 eventos de desoves independientes. Además, se desarrollaron 3 réplicas técnicas, las cuales a su vez fueron evaluadas en triplicado en cada PCR. Por lo tanto, el modelo estadístico que se utilizó para el análisis fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \pi_j + (\tau\pi)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Y_{ijk} = Expresión relativa promedio de un gen objetivo (Bax, Caspasa-9, Capasa-3 y Bcl-2) o el promedio de Ct (ACT β , MAP 1 β , GAPDH y 18S).

μ = Media poblacional.

τ_i = Expresión promedio del estadio i del desarrollo embrionario ($i= 1-5$).

π_j = Expresión promedio del nivel de flotabilidad de j ($j= 1$: flotante y 2 : no flotantes)

$(\tau\pi)_{ij}$ = Interacción entre la expresión del estadio del desarrollo embrionario y el nivel de flotabilidad.

ε_{ijk} = Error aleatorio asociado a la observación Y_{ijr} .

La expresión relativa fue expresada como el promedio \pm la desviación estándar y los datos se analizaron por ANOVA con el Programa InfoStat, versión 2004; Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Las diferencias significativas entre promedios fueron evaluadas usando la prueba de Tukey y $p < 0,05$.

RESULTADOS

Se observó que los genes que promueven la apoptosis celular: Bax, Caspasa-9 y Caspasa-3, al igual que el gen anti-apoptótico Bcl-2, se expresaron en los 5 estadios del desarrollo embrionario temprano de *Seriola Lalandi*: huevo (H), mórula (M), blástula (B), gástrula (G) y embrión de 24 horas (E), tanto en huevos y embriones flotantes como no flotantes.

1. Expresión relativa de Bax

Los ARNs mensajeros que codifican para Bax en las muestras flotantes se expresaron de forma similar en los 5 estadios del desarrollo embrionario evaluados en este estudio. Mientras que, en los huevos y embriones no flotantes se observó un aumento creciente de expresión desde el estadio de huevo hasta el estadio de gástrula, disminuyendo de forma marcada en los embriones de 24 horas. En las muestras no flotantes se evidenció diferencia significativa en gástrula, donde hubo una mayor expresión de este gen, con respecto a las otras 4 etapas del desarrollo. También, en las muestras no flotantes se observó diferencias significativas entre embrión de 24 horas con huevo, mórula, blástula y gástrula. Al comparar la expresión relativa entre huevos y embriones flotantes y no flotantes, se observaron diferencias significativas en los estadios de huevo, mórula, blástula y gástrula (Figura N°1).

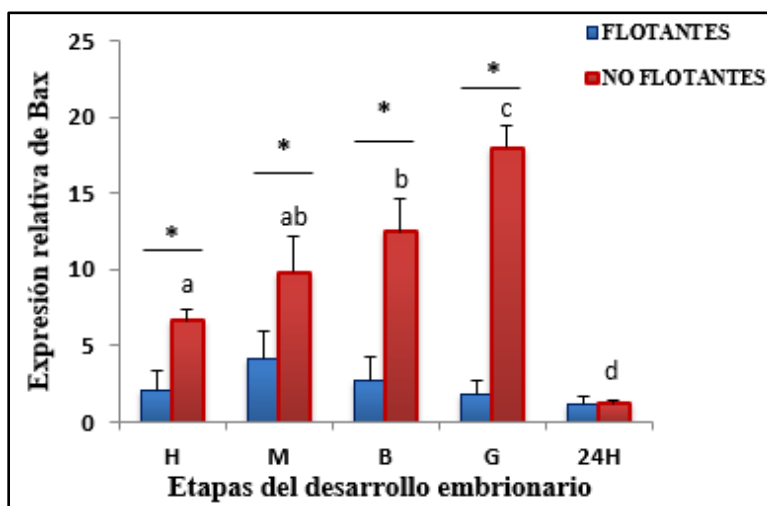


Figura N°1: Expresión relativa de Bax en 5 etapas del desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi* de acuerdo con su nivel de flotabilidad.

a-d: Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las etapas del desarrollo embrionario en muestras no flotantes.

(*): Diferencia significativa ($p < 0,05$) entre muestras flotantes y no flotantes.

2. Expresión relativa de Caspasa-9

Los ARNs mensajeros que codifican para Caspasa-9 en las muestras flotantes, tuvieron una expresión similar hasta el estadio de gástrula, existiendo sólo diferencias significativas entre este estadio y los embriones de 24 horas. En los huevos y embriones no flotantes se evidenció una mayor expresión en blástula, mostrando diferencias significativas con los niveles de expresión de este gen en huevos, mórulas y gástrulas. Al comparar la expresión relativa de Caspasa-9 entre huevos y embriones flotantes y no flotantes, se observó que solamente en la etapa de blástula existen diferencias significativas (Figura N°2).

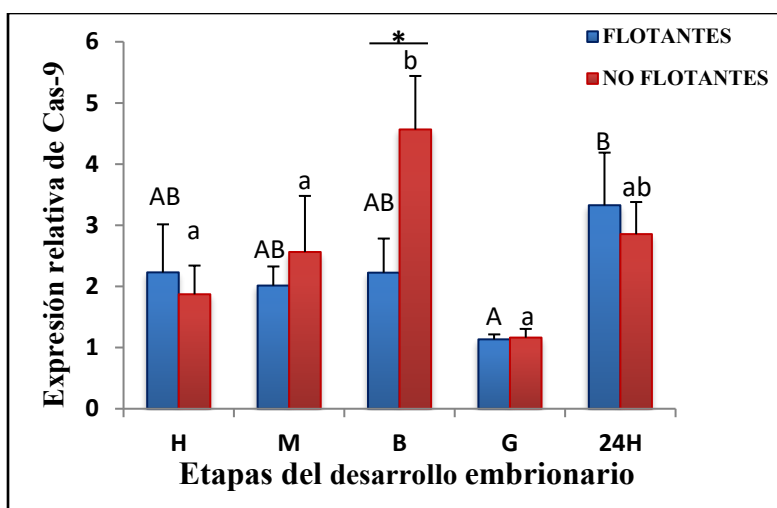


Figura N°2: Expresión relativa de Caspasa-9 en 5 etapas del desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi* de acuerdo con su nivel de flotabilidad.

a-b: Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las etapas del desarrollo embrionario en muestras no flotantes.

A-B: Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las etapas del desarrollo embrionario en muestras flotantes.

(*): Diferencia significativa ($p < 0,05$) entre muestras flotantes y no flotantes.

3. Expresión relativa de Caspasa-3

Los ARNs mensajeros que codifican para Caspasa-3 en las muestras flotantes no presentaron diferencias significativas a través del desarrollo embrionario. Sin embargo, en las muestras no flotantes se observó un aumento marcado de la expresión de este gen desde el estadio de mórula hasta el estadio de gástrula. Posteriormente, en embriones de 24 horas disminuyó significativamente la expresión de Caspasa-3. Al comparar la expresión relativa de Caspasa-3 entre huevos y embriones flotantes y no flotantes, se observaron mayores niveles de

expresión este gen en embriones no flotantes de los estadios de blástula y gástrula. (Figura N°3).

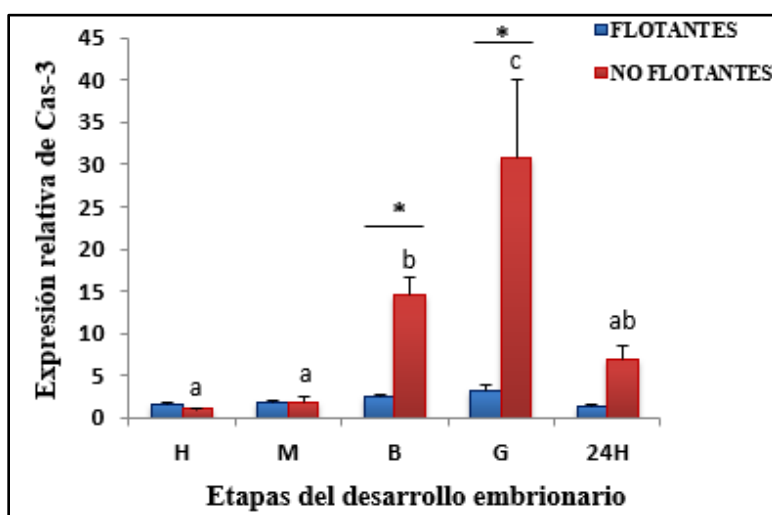


Figura N°2: Expresión relativa de Caspasa-3 en 5 etapas del desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi* de acuerdo con su nivel de flotabilidad.

a-c: Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las etapas del desarrollo embrionario en muestras no flotantes.

(*): Diferencia significativa ($p < 0,05$) entre muestras flotantes y no flotantes.

4. Expresión relativa de Bcl-2

Los ARNs mensajeros que codifican para Bcl-2 en las muestras flotantes presentaron un significativo aumento en su expresión desde los huevos al estadio de mórula. Posteriormente, la expresión de este gen disminuyó en forma progresiva hasta el estadio de gástrula, permaneciendo sin variación en embriones de 24 horas. En las muestras no flotantes, no se evidenciaron diferencias significativas entre las 5 etapas del desarrollo. Tampoco se observaron diferencias significativas al comparar la expresión de este gen entre muestras flotantes y no flotantes (Figura N°4).

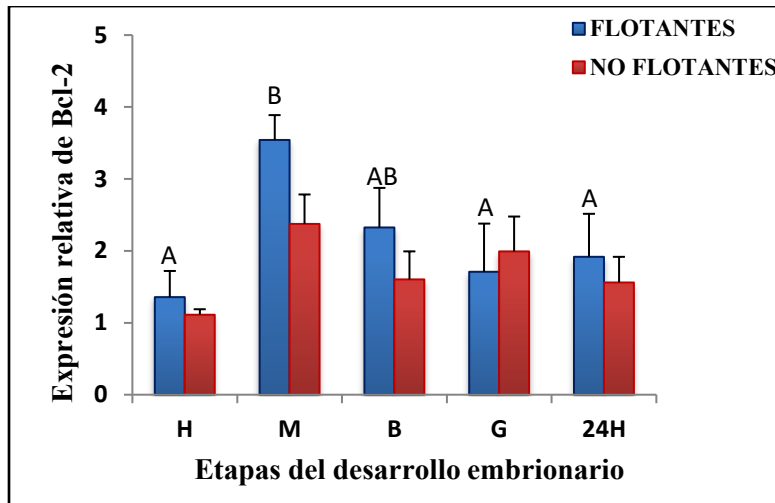


Figura N°4: Expresión relativa de Bcl-2 en 5 etapas del desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi* de acuerdo con su nivel de flotabilidad.

A-B: Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las etapas del desarrollo embrionario en muestras flotantes.

(*): Diferencia significativa ($p < 0,05$) entre muestras flotantes y no flotantes.

5. Expresión de genes constitutivos

Los ARNm que codifican para ACT β , MAP 1 β , GAPDH y 18S se expresaron de forma similar en los 5 estadios del desarrollo temprano de *S. lalandi*, no existiendo diferencias significativas entre embriones flotantes y no flotantes en los 4 genes (Figuras N°5-8).

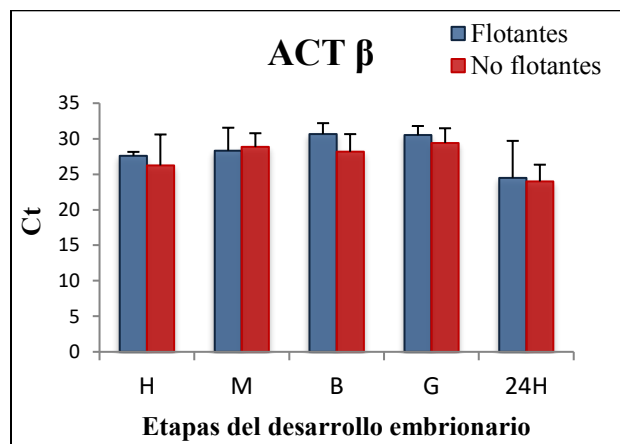


Figura N°5: Valores de Ct de ACT β en 5 etapas del desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi* de acuerdo con su nivel de flotabilidad.

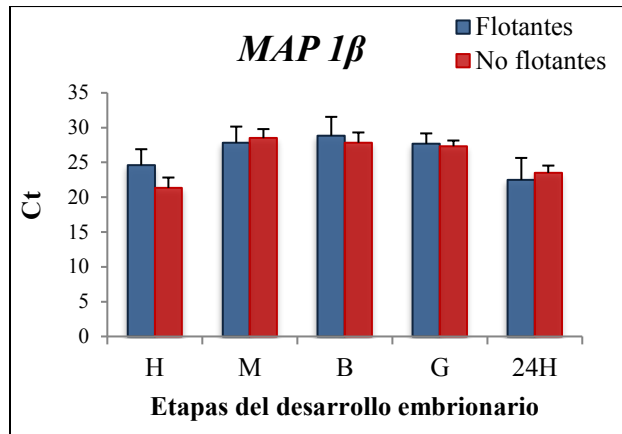


Figura N°6: Valores de Ct de MAP 1 β en 5 etapas del desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi* de acuerdo con su nivel de flotabilidad.

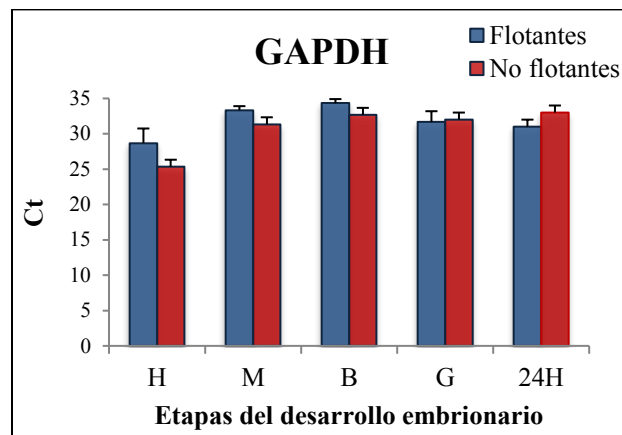


Figura N°7: Valores de Ct de GAPDH en 5 etapas del desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi* de acuerdo con su nivel de flotabilidad.

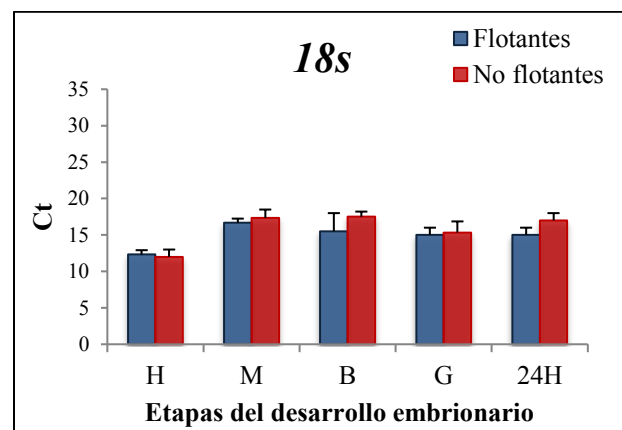


Figura N°8: Valores de Ct de 18S en 5 etapas del desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi* de acuerdo con su nivel de flotabilidad.

DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó expresión de ARNs mensajeros que codifican para distintos factores que participan en la apoptosis celular durante el desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi*, relacionando los niveles de expresión de estos genes con la flotabilidad de los huevos y embriones. De esta manera, se observó que los ARNm que codifican para Bax, Caspasa-9, Caspasa-3 y Bcl-2 se expresaron en las 5 etapas del desarrollo evaluadas en este trabajo, tanto en embriones flotantes como no flotantes. La presencia de estos genes indicaría que la apoptosis celular se lleva a cabo con normalidad durante el desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi* de forma similar a lo que se ha observado en diferentes especies de vertebrados e invertebrados (Agnello *et al.*, 2015; Penaloza *et al.*, 2006), siendo fundamental para la remoción del número excesivo de células que comúnmente se producen en este proceso (Elmore, 2007).

En todos los organismos, los primeros procesos que ocurren en el embrión son dirigidos por factores maternos incluyendo el ARNm producido durante la ovogénesis almacenado en el ovocito maduro. Estas transcripciones maternas influyen hasta que el genoma cigótico es activado y los individuos recién formados son capaces de controlar progresivamente su expresión génica de forma autónoma en el periodo de transición de blástula media (Miccoli *et al.*, 2015). El desarrollo exitoso de las larvas en los peces se determina durante las primeras etapas de la embriogénesis y los estudios durante el desarrollo embrionario han demostrado que los factores maternos regulan varios procesos como la formación de patrones de establecimiento de líneas germinales, la gastrulación, la neurogénesis y la somatogénesis (Pelegrí, 2003). Los factores maternos, además, regularían la expresión génica de proteínas que participan en la apoptosis celular (Yabu *et al.*, 2001; Miccoli *et al.*, 2015).

El pez cebra (*Danio rerio*) ha sido utilizado como modelo para el estudio de la apoptosis durante el desarrollo embrionario temprano. En esta especie, se ha evidenciado que el ARNm que codifica para Caspasa-3, está presente como un factor materno en los embriones tempranos de este pez (Yabu *et al.*, 2001). También, se analizó la expresión de ARNm que codifica para Bax, Bcl-2 y Caspasa-3 (Miccoli *et al.*, 2015), donde se observó una disminución en la expresión hasta antes del período de transición a blástula media y un aumento de expresión posterior a esta etapa. En el presente estudio, no se observó una

disminución en la expresión de estos genes hasta el estadio de blástula, pero los niveles de ARNm de Bax y Caspasa-3 aumentaron significativamente después de este período en las muestras no flotantes. Estos resultados pueden indicar un patrón diferente de expresión de los genes apoptóticos entre estas especies, la cual se relacionaría con la flotabilidad de los huevos y los embriones tempranos. *Danio rerio* es un pez de agua dulce y desovador demersal, por lo que sus huevos y embriones no presentan flotabilidad positiva como los de *S. lalandi*. Por lo tanto, al comparar estas dos especies, es posible que los mecanismos de apoptosis no sean tan importantes en el pez cebra en las etapas tempranas del desarrollo, asemejándose a lo que ha sido descrito para la mayoría de los genes maternos. Por el contrario, los niveles estables de expresión de estos genes en muestras flotantes y el aumento de éstos en las muestras no flotantes, indicaría que en *S. lalandi* existe una participación de factores maternos que son expresados desde el inicio del desarrollo, indicando a la vez, que los mecanismos de apoptosis son importantes en las etapas tempranas de este proceso y que estos mecanismos se relacionarían directamente con el nivel de flotabilidad que presentan los huevos y embriones tempranos en esta especie.

Los niveles de ARNm de Bax y Caspasa-3 fueron mayores en las muestras no flotantes, donde se observó un patrón creciente de expresión de éstos hasta el estadio de gastrula. Posteriormente, se observó una disminución en los niveles de ARNm de Bax y Caspasa-3 en los embriones de 24 horas. Esta disminución podría deberse a que luego de la gastrulación comienza el proceso organogénesis, donde la muerte celular es crucial para la remodelación tisular (Penalosa *et al.*, 2006). Por lo tanto, se podría presumir que a esa altura del desarrollo los genes ya fueron traducidos a proteínas para llevar a cabo la apoptosis durante la formación de tejidos y órganos, como ha sido demostrado en *Danio rerio* (Cole y Ross, 2001) y en mamíferos (Mohamed y Amemiya, 2003). Por otro lado, la expresión de ARNm que codifica para Caspasa-3 en las muestras no flotantes presentó bajos niveles durante las etapas de huevo y mórula en comparación a los tres estadios posteriores. Este resultado concuerda con el papel de enzima efectora que se ha descrito para Caspasa-3 tardándose más en su activación que otras enzimas que participan en este proceso (Rojas *et al.*, 2009). También, se observaron mayores niveles de ARNm de Caspasa-9 en blástulas en comparación a gástrulas no flotantes, coincidiendo con el rol descrito para esta enzima como iniciadora de las reacciones que llevan a la célula a apoptosis (Elmore, 2007). La expresión del ARNm que

codifica para Bcl-2 fue similar tanto en embriones flotantes como no flotantes. Por lo tanto, y considerando la característica anti-apoptótica de Bcl-2, se puede inferir que durante el desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi*, existe una regulación génica del proceso de apoptosis, específicamente, de las proteínas que participan en la vía intrínseca de este proceso.

En especies pelágicas, no existe información sobre la expresión de los 4 genes estudiados durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, se han observado diferencias morfológicas y bioquímicas relacionadas con la apoptosis entre huevos flotantes y no flotantes de *Sparus aurata*. En esta especie, se demostró que los huevos que se hunden tienen una capacidad de síntesis de proteínas y ARN más baja, lo que conlleva a que sean menos activos que los flotantes (Carnevali *et al.*, 2001b) y que, además, los huevos no flotantes presentan contracción celular, participación del sistema FAS/FAS-L, fragmentación del ADN y aumento de volumen de las mitocondrias (Carnevali *et al.*, 2003). Estas características, aún no sido estudiadas en los huevos de *S. lalandi*, pero los mayores niveles de expresión de Bax en los huevos no flotantes de esta especie, indicarían una posible relación entre este transcrito y la pérdida de flotabilidad. Por lo tanto, es esperable que las características observadas en los huevos no flotantes de *Sparus aurata* también sean propias de los embriones no flotantes de *S. lalandi*, lo cual debe ser abordado en futuros estudios.

Por otra parte, sí existen evidencias en especies pelágicas que demuestran la importancia de las catepsinas y la proteólisis de las PVs (Carnevali *et al.*, 2006; Fabra *et al.*, 2006). Este proceso es fundamental para que el huevo adquiera una flotabilidad positiva, condición que se ha relacionado con la viabilidad de los huevos y embriones tempranos en estas especies (Carnevali *et al.*, 2001b). La expresión de ARNm que codifica para catepsinas B, L y D ha sido estudiada durante el desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi* (Palomino *et al.*, 2017; Rodríguez, 2016). En estos trabajos no se observaron diferencias de expresión de catepsina B entre huevos y embriones flotantes y no flotantes a través del desarrollo. Sin embargo, se obtuvo una mayor expresión de catepsina D en huevos no flotantes y de catepsina L en huevos, gástrulas y embriones de 24 horas flotantes. La elevada expresión de catepsina D encontrada en huevos no flotantes de *S. lalandi*, en comparación con los flotantes, concuerda con los altos niveles de actividad de esta enzima encontrados en huevos

no flotantes de *Dicentrarchus labrax* (Carnevali *et al.*, 2001a) y de *Sparus aurata* (Carnevali *et al.* 2001b), en donde se ha propuesto la participación de esta enzima como mediadora del proceso de apoptosis en esta última especie (Carnevali *et al.*, 2003). Esta inferencia, coincide con la alta expresión del gen pro-apoptótico Bax observada en huevos no flotantes de *S. lalandi*, en los cuales catepsina D podría tener un papel importante en la apoptosis celular.

Finalmente, con el propósito de entregar una mayor objetividad al presente estudio se analizó la actividad transcripcional en huevos y embriones flotantes y no flotantes de *S. lalandi*, evaluándose la expresión de 4 genes constitutivos (ACT β , MAP 1 β , GAPDH y 18S) que comúnmente son utilizados como referencia en estudios de expresión génica. De esta manera, se esperaba corroborar que los genes objetivos eran expresados debido a factores endógenos y no gracias a condiciones exógenas desfavorables que podrían estar perjudicando su viabilidad. Cabe mencionar que las actinas son un componente esencial del citoesqueleto y su isoforma β 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). MAP 1 β es el principal constituyente de los polímeros de microtúbulos, los cuales son vitales para llevar a cabo procesos del desarrollo embrionario como el primer movimiento celular o epibolia que ocurre durante la gastrulación y la cohesión de los blastómeros postcitocinéticos observados en el pez cebra (Solnica-Krezel y Driever, 1994). GAPDH es una enzima de expresión constitutiva que cumple un rol importante en la vía glicolítica, llevando a cabo, además, distintas funciones metabólicas (Sirover, 2011) y 18s es un constituyente de la unidad ribosomal, participando en la síntesis de proteínas (Lafontaine y Tollervey, 2004). La expresión de estos genes constitutivos no presentó variaciones significativas a través del desarrollo y no fue afectada por el nivel de flotabilidad de las muestras analizadas en el presente estudio. Estos resultados permitieron evidenciar una actividad transcripcional estable en las muestras, lo cual entrega una mayor confiabilidad a los hallazgos encontrados en la expresión de los factores apoptóticos a través del desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi*.

CONCLUSIÓN

Los genes que codifican para Bax, Caspasa-9, Caspasa-3 y Bcl-2 fueron expresados durante las 5 etapas del desarrollo embrionario temprano evaluadas en este trabajo sin importar el nivel de flotabilidad de los embriones, indicando que la apoptosis se lleva a cabo con normalidad desde el inicio del desarrollo de *S. lalandi*.

Los altos niveles de expresión de los genes que codifican para Bax y Caspasa-3 en algunos embriones no flotantes, indicarían la participación de mecanismos apoptóticos en la pérdida de flotabilidad de los embriones tempranos de esta especie.

BIBLIOGRAFÍA

- **AGNELLO, M.; BOSCO, L.; CHIARELLI, R.; MARTINO, C.; ROCCHERI, C.** 2015. The role of autophagy and apoptosis during embryo development. **In:** Tobias M (Ed) Cell death – Autophagy, Apoptosis and Necrosis. InTech, DOI: 10.5772/61765.
- **BUNNELL, T.; BURBACH, B.; SHIMIZU, Y.; ERVASTI, J.** 2011. β -Actin specifically controls cell growth migration, and the G-actin pool. *Mol. Biol. Cell.* 22:4047-4058.
- **CARNEVALI, O.; MOSCONI, G.; CAMBI, A.; RIDOLFI, S.; ZANUY, S.; POLZONETTI-MAGNI, A.** 2001a. Changes of lysosomal enzyme activities in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) eggs and developing embryos. *Aquaculture* 239: 445- 465.
- **CARNEVALI, O.; MOSCONI, G.; CARDINALI, M.; MEIRI, I.; POLZONETTI-MAGNI, A.** 2001b. Molecular components related to egg viability in the gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Mol Reprod Dev* 58:330-335.
- **CARNEVALI, O.; POLZONETTI, V.; CARDINALI, M.; PUGNALONI, A.; NATALINI, P.; ZMORA, N.; MOSCONI, G.; POLZONETTI-MAGNI, A.** 2003. Apoptosis in sea bream *Sparu saurata* eggs. *Mol Reprod Dev* 66: 291-296.
- **CARNEVALI, O.; CIONNA, C.; TOSTI, L.; LUBZENS, E.; MARADONNA, F.** 2006. Role of cathepsins in ovarian follicle growth and maturation. *Gen Comp Endocr* 146:195-203.
- **CERDA, J.** 2002. Mecanismos fisiológicos durante la hidratación del huevo de teleósteos: hacia el desarrollo de nuevos métodos de criopreservación. *Bol Inst Esp Oceanogr* 18: 145-152.
- **COLE, L; ROSS, L.** 2001. Apoptosis in the developing zebrafish embryo. *Deve Biol* 240(1) 123–142.
- **ELMORE, S.** 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495–516.

- **FABRA, M.; RALDÚA, D.; BOZZO, M.; DEEN, P.; LUBZENS, E.; CERDA, J.** 2006. Yolk proteolysis and aquaporin-1 o play essential roles to regulate fish oocyte hydration during meiosis resumption. *Dev Biol* 295: 250- 262.
- **HERRERA, G.** 2013. Expresión de catepsinas durante el desarrollo embrionario temprano en el pez dorado (*Seriola lalandi* Valenciennes 1833). Memoria de Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. de Chile, Facultad de Cs. Veterinarias y Pecuarias. 53 p.
- **HIRAMATSU, N.; HARA, A.; HIRAMATSU, K.; FUKADA, H.; WEBER, GM.; DENSLOW, ND, SULLIVAN, CV.** 2002. Vitellogenin-derived yolk proteins of white perch, *Morene americana*: Purification, characterization, and vitellogenin- receptor binding. *BiolReprod* 67:655-667.
- **JAYAKIRAN, M.** 2015. Apoptosis-Biochemistry:A Mini Review. *J Clin Exp Pathol* 5:1.
- **LAFONTAINE, L.; TOLLERVEY, D.** 2001. Ribosomal RNA. *Encyclopedia of life sciences*.
- **MICCOLI, A.; GIOACCHINI, G.; MARADONNA, F.; BENATO, F.; SKOBO, T.; CARNEVALI, O.** 2015. Beneficial bacteria affect *Danio rerio* development by the modulation of maternal factors involved in autophagic, apoptotic and dorsalizing processes. *Cell Physiol Biochem*; 35:1706-1718.
- **MOHAMED, Y.; AMEMIYA, T.** 2003. Apoptosis and lens vesicle development. *Eur J Ophthalmol* 13(1):1–10
- **MORAIS, R.; THOMÉ, R.; SANTOS, H.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E.** 2016. Relationship between bcl-2, bax, beclin-1, and cathepsin-D proteins during postovulatory follicular regression in fish ovary. *Theriogenology* 85: 1118–1131.
- **MORAN, D.; SMITH, C.; GARA, B.; POORTERNAAR, C.** 2007, Reproductive behavior and early development in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi* Valenciennes 1833). *Aquaculture* 262:95-104.
- **NAGAHAMA, Y.; YAMASHITA, M.** 2008. Regulation of oocyte maturation in fish. *Dev Growth Differ* 50: 195- 219.

- **PALOMINO, J.; HERRERA, G.; TORRES-FUENTES, J.; DETTLEFF, P.; PATEL, A.; MARTINEZ, V.** 2017. Assessment of cathepsin mRNA expression and enzymatic activity during early embryonic development in the yellowtail kingfish *Seriola lalandi*. *Anim Reprod Sci* 180: 23–29.
- **PATEL, A.; DETTLEFF, P.; HERNANDEZ, E.; MARTINEZ, V.** 2016. A comprehensive transcriptome of early development in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). *Mol Ecol Resour.* 16: 364-376.
- **PFAFFL, M.** 2004. Quantification strategies in real-time PCR. *AZ of quantitative PCR* 3: 87-112.
- **PENALOZA, C.; LIN, L.; LOCKSHIN R.; ZAKERI Z.** 2006. Cell death in development: shaping the embryo. *Histochem Cell Biol* 126:149–158.
- **PELEGRI, F.** 2003. Maternal factors in zebrafish development. *Dev. Dyn.* 228, 535–554.
- **POORTERNAR, C.; HOOKER, S.; SHARP, N.** 2001. Assessment of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) reproductive physiology, as a basic for aquaculture development. *Aquaculture* 201:271-286.
- **RODRÍGUEZ, J.** 2016. Expresión de enzimas involucradas en la adquisición de la flotabilidad de huevos y embriones de *Seriola lalandi*. Memoria de Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. de Chile, Facultad de Cs. Veterinarias y Pecuarias. 28 p.
- **ROJAS, M.; SALMEN, S.; BERRUETA, L.** 2009. Muerte celular programada: I. Activación y mecanismos de regulación. *RMEP-ULA* 4: 96-106.
- **SIROVER, M.** 2011. On the functional diversity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: biochemical mechanisms and regulatory control. *Biochim Biophys* 1810:741-51.
- **SOLNICA-KREZEL, L.; DRIEVER, W.** 1994. Microtubule arrays of the zebrafish yolk cell: organization and function during epiboly. *Development.* 120:2443-2455.

- **THOMÉ, R.; DOMINGOS, F.; SANTOS, H.; MARTINELLI, P.; SATO, Y.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N.** 2012. Apoptosis, cell proliferation and vitellogenesis during the folliculogenesis and follicular growth in teleost fish. *Tissue Cell* 44:54-62.

- **VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F.** 2002. Accurate normalization real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: RESEARCH0034.

- **YABU, T.; KISHI, S.; OKAZAKI, T.; YAMASHITA, M.** 2001. Characterization of zebrafish caspase-3 and induction of apoptosis through ceramide generation in fish fathead minnow tailbud cells and zebrafish embryo. *Biochem. J.* 360, 39–47