



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

**EXPRESIÓN DEL SISTEMA FAS/FAS-L y CASPASA-8 EN
EMBRIONES TEMPRANOS DE *Seriola lalandi* CON DIFERENTE
NIVEL DE FLOTALIDAD**

María Teresa Otárola Carrasco

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

PROFESOR GUÍA: JAIME ALFREDO PALOMINO MACKENNEY

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

Proyecto FONDECYT 11140639

SANTIAGO, CHILE

2018



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

**EXPRESIÓN DEL SISTEMA FAS/FAS-L y CASPASA-8 EN
EMBRIONES TEMPRANOS DE *Seriola lalandi* CON DIFERENTE
NIVEL DE FLOTALIDAD**

María Teresa Otárola Carrasco

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

Nota Final.....

Firma

Prof. Guía Dr. Jaime Palomino M.

Prof. Corrector Dra. Mónica De Los Reyes S.

Prof. Corrector Dr. Pedro Smith S.

SANTIAGO, CHILE

2018

AGRADECIMIENTOS

Al fin ha culminado una de las etapas más importantes de mi vida, .me siento una persona afortunada y profundamente agradecida de quienes me rodean y fueron participe de este proyecto que culmina y da fin a una etapa de mi vida. Infinitas gracias al gestor del proyecto profesor Jaime palomino por toda la ayuda y apoyo incondicional entregado todo este tiempo, gracias a mis padres por entregarme herramientas y valores para poder desenvolverme como persona y ahora como profesional, a mis hermanas y sobrinos por estar siempre presente, a mi compañero de aventuras por el apoyo, paciencia y el amor incondicional en todos estos años.

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

ÍNDICE DE CAPÍTULOS.....	i
ÍNDICE DE TABLAS.....	ii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
RESÚMEN.....	iii
ABSTRACT.....	iv

Introducción.....	1
Revisión bibliográfica.....	2
Hipótesis.....	7
Objetivos.....	7
Materiales y Métodos.....	8
Resultados.....	12
Discusión.....	14
Conclusiones.....	19
Bibliografía.....	20
Anexos.....	27

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Gen, secuencia y eficiencia de los partidores para Caspasa 8 y genes constitutivos.	27
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Análisis por Western blot de la proteína Fas durante el desarrollo embrionario temprano de <i>S. lalandi</i> , en muestras flotantes.....	28
--	----

Figura 2: Análisis por Western blot de la proteína Fas durante el desarrollo embrionario de <i>S. lalandi</i> , en muestras no flotantes.....	29
--	----

Figura 3: Análisis por Western blot de la proteína Fas-L durante el desarrollo embrionario de <i>S. lalandi</i> , en muestras flotantes.....	30
---	----

Figura 4: Análisis por Western blot de la proteína Fas-L durante el desarrollo embrionario de <i>S. lalandi</i> , en muestras no flotantes.....	31
--	----

Figura 5: Curva de Melt obtenida en los experimentos de RT-qPCR para los partidores de Caspasa 8.....	32
--	----

Figura 6: Expresión relativa de Caspasa 8 evaluada mediante RT-qPCR en el desarrollo embrionario temprano de <i>S. lalandi</i> en muestras flotantes y no flotantes.....	33
---	----

Figura 7: Análisis de expresión de los genes constitutivos ACTB (A), 18S (B), GAPDH (C) y MAP1 β (D), durante el desarrollo embrionario temprano de <i>S. lalandi</i> en muestras flotantes y muestras no flotantes.....	34
---	----

RESUMEN

La mortalidad embrionaria que se ha observado en condiciones de cultivo del pez dorado *Seriola lalandi*, puede ser mencionada entre los principales obstáculos que han frenado el desarrollo acuícola de esta especie en nuestro país. Esta mortalidad se relaciona a la pérdida de flotabilidad de los huevos y embriones tempranos, la cual se debería a la participación del mecanismo de apoptosis celular. Estudios previos demostraron una mayor expresión de moléculas que participan en la vía intrínseca de este proceso, en huevos y embriones de *S. lalandi* con bajo nivel de flotabilidad. Por lo tanto, en este trabajo se propuso determinar si en esta pérdida de flotabilidad participan también moléculas de la vía extrínseca, como el sistema Fas/FasL y Caspasa 8. Para esto, se evaluó mediante la técnica de *Western Blot* la expresión de las proteínas Fas y Fas-L y mediante RT-qPCR la expresión del ARNm de Caspasa 8 en embriones tempranos de *S. lalandi* clasificados como flotantes y no flotantes. La proteína Fas se expresó como una banda de 50 kDa en todos los estadios en las muestras flotantes. Sin embargo, en los no flotantes este receptor se detectó en tres bandas reactivas de 40, 50 y 65 kDa. FasL (44 kDa) sólo fue detectado en embriones flotantes de 24 horas, mientras que en las muestras no flotantes este ligando se detectó en todos los estadios con un aumento ($p < 0,05$) en su expresión, en la medida que avanzó el desarrollo. Por otro lado, los mayores niveles ($p < 0,05$) de ARNm de Caspasa 8 se observaron en embriones de 24 horas en las muestras flotantes y a partir del estado de gástrula en los no flotantes. Además, la expresión de Caspasa 8 fue mayor ($p < 0,05$) en las muestras no flotantes, en comparación con las flotantes en todos los estadios del desarrollo. Estos resultados, confirman la presencia de moléculas de la vía extrínseca de la apoptosis en huevos y embriones tempranos de *S. lalandi*, con perfiles de expresión en las muestras no flotantes que representarían un estado pre-apoptótico de estas muestras. Sin embargo, se requieren estudios especie-específicos y complementarios para entender principalmente, la naturaleza del agente inductor de la activación de esta vía. Finalmente, se asume que existió una viabilidad funcional comparable entre las muestras flotantes y no flotantes en todos los estadios del desarrollo analizados, debido a que no se encontraron diferencias ($p < 0,05$) en los valores promedio de Ct, entre estas muestras, de cuatro genes constitutivos (ACTB, 18S, GAPDH y MAP1 β).

ABSTRACT

The embryonic mortality observed under captivity in the yellow-tail kingfish *Seriola lalandi* could be mentioned among the main obstacles that have avoided its aquaculture development in our country. This mortality has been related to low buoyancy of eggs and early embryos, which would be due to the participation of the apoptosis mechanism. Previous results in *S. lalandi* have demonstrated greater expression of apoptosis intrinsic pathway molecules in eggs and embryos with low buoyancy level. Therefore, this work aimed in to determine if molecules of the extrinsic pathway such as Fas/FasL system and Caspase 8 are involved in the buoyancy losing. For this, Fas/FasL system and Caspase 8 expression were evaluated in early embryos of *S. lalandi* previously classified as floating and non-floating, by Western Blot and RT-qPCR, respectively. Fas protein was expressed as a 50 kDa band in all floating developmental stages. However, in non-floating this receptor was detected in three reactive bands of 40, 50 and 65 kDa. FasL (44 kDa) was only detected in 24-hour floating embryos, whereas in the non-floating samples this ligand was detected in all stages with an increase ($p < 0,05$) in its expression as development progressed. By other hand, the highest levels ($p < 0,05$) of Caspase 8 mRNA were observed in 24 hours embryos in floating samples and from gastrula stage in the non-floating ones. In addition, Caspase 8 expression was higher ($p < 0,05$) in non-floating than floating samples, in all developmental stages. These results confirm the presence of apoptosis extrinsic pathway molecules in eggs and early embryos of *S. lalandi*, which show expression profiles in the non-floating samples that could be interpreted as apoptotic pre-activation. However, species-specific studies are required to understand the nature of the apoptotic pathway trigger. Finally, a comparable viability between floating and non-floating samples used in this study could be assumed since no differences ($p < 0,05$) in Ct value of constitutive genes (ACTB, 18S, GAPDH and MAP1 β) were detected these samples.

INTRODUCCIÓN

La acuicultura en Chile ha ganado paulatinamente importancia dentro de la valoración de la actividad pesquera nacional y es considerada actualmente como el sector productivo con mayores perspectivas de crecimiento. Según cifras del Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura la producción total ha ido en aumento de forma exponencial desde 180 mil toneladas en 1994 a 1.1 millones de toneladas en 2013. El 95% de la producción acuícola de pescado en Chile, corresponde a salmónidos y las actividades de cultivo se centran principalmente en dos regiones del país: La regiones de los Lagos y la Araucanía. Por lo tanto, se ha hecho necesario promover la diversificación del sector en un marco de sustentabilidad ambiental y equidad en el acceso a la actividad. De este modo, a través del Programa para la Diversificación de la Acuicultura Chilena (PDACH) instaurado por FONDEF de CONICYT, INNOVA CHILE de CORFO y la División de Innovación de la Subsecretaría de Economía, se ha fomentado el cultivo del pez *Seriola lalandi*, comúnmente conocido como dorado o palometa.

S. lalandi es un pez pelágico marino de distribución mundial que se ha caracterizado por presentar atractivas características productivas como un rápido crecimiento, buena calidad de la carne y una creciente demanda mundial (Stuart y Drawbridge, 2012; Poortenaar *et al.*, 2001). Sin embargo, el ciclo completo de producción de esta especie ha sido difícil de lograr debido principalmente a una alta mortalidad durante las etapas embrionarias y larvales (Morán *et al.*, 2007). Estudios en especies de peces pelágicos han propuesto entre las causas de esta baja sobrevivencia, la pérdida de flotabilidad de los huevos y embriones tempranos (Sawaguchi *et al.*, 2006; Sundby y Kristiansen, 2006; Carnevali *et al.*, 2001). La calidad y viabilidad de los embriones en las especies pelágicas depende de la proporción de éstos que mantienen una flotabilidad positiva, por lo que aquellos que pierden esta característica están destinados a morir en algún momento del desarrollo embrionario.

La participación de mecanismos asociados al proceso de muerte celular programada o apoptosis celular se ha propuesto entre las causas que explicarían la pérdida de flotabilidad de los huevos y embriones de peces pelágicos (Gómez, 2018; Rodríguez, 2017; Thomé *et al.*, 2012; Carnevali *et al.*, 2003). En estudios recientes en *S. lalandi*, se demostró la expresión de ARNs mensajeros que codifican diferentes moléculas que participan en la apoptosis que se gatilla por estímulos internos de la célula (Gómez, 2018; Palomino *et al.*,

2017b; 2016). En estos trabajos se pudo observar que en algunos estadios del desarrollo embrionario temprano, los niveles de genes pro-apoptóticos tales como Bax, Caspasa 9 y Caspasa 3, fueron mayores en embriones no flotantes en comparación a los flotantes, lo cual es indicativo de la participación de la apoptosis en la pérdida de flotabilidad de los embriones de *S. lalandi*, a través de moléculas de la vía intrínseca de este proceso. Sin embargo, no existen antecedentes referentes a la participación de moléculas involucradas en la vía extrínseca de la apoptosis en la pérdida de flotabilidad de los huevos y embriones de esta especie. Por lo tanto, en este trabajo se analizó la expresión de tres moléculas asociadas a la vía extrínseca de la apoptosis, el sistema Fas/Fas-L y la expresión del ARNm que codifica una de las principales enzimas involucradas en esta vía, la Caspasa 8.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Características generales

Seriola lalandi es un pez pelágico de la familia Carangidae 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 una especie migratoria que llega al norte de Chile, en los meses estivales, sustentando la actividad pesquera artesanal entre la II y IV Región (Nakada, 2008). Se ha propuesto que la población que habita el Océano Pacífico se reproduce principalmente en las costas de Japón, llegando a Chile como juvenil y adulto. 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). Sin embargo, en cultivo esta especie presenta una elevada mortalidad (95% de los huevos cultivados) durante el período embrionario y larval (Stuart y Drawbridge, 2012; Morán *et al.*, 2007), situación que también ha sido observada en los cultivos de nuestro país (Palomino *et al.*, 2017a; 2014). La falta de conocimiento de las bases biológicas que dirigen el proceso reproductivo en esta especie han dificultado aún más la búsqueda de soluciones para el problema de sobrevivencia recientemente mencionado. En *S. lalandi*, además de lo reportado por nuestro grupo de trabajo acerca de la expresión de genes importantes para la sobrevivencia de huevos y embriones tempranos (Palomino *et al.*, 2017a; 2014), existe un trabajo en el cual se describieron los niveles plasmáticos de hormonas sexuales en individuos silvestres

(Poortenaar *et al.*, 2001). Sin embargo, antecedentes referentes a la función ovárica, formación y maduración de los ovocitos, no existen en esta especie. Estos antecedentes, son fundamentales para conocer los mecanismos que determinan la ovogénesis y que repercuten en el desarrollo temprano de los embriones en estos peces y las variables que podrían estar influyendo en la mortalidad de éstos.

Crecimiento y maduración de los ovocitos en peces teleósteos

El principal evento responsable del crecimiento del ovocito de los peces teleosteos es la acumulación de las proteínas del vitelo (PVs) en su citoplasma, en un proceso que se denomina vitelogénesis (Devlin y Nagahama, 2002). En este proceso, la hormona FSH estimula en las células foliculares la síntesis de estradiol, que a su vez induce la producción hepática y liberación de las vitelogeninas (VTGs) al plasma sanguíneo (Carnevali *et al.*, 2006). Las VTGs se transportan hasta el ovario, donde son reconocidas por receptores específicos y endocitadas por los ovocitos a través de vesículas que se fusionan con los lisosomas en el citoplasma cortical constituyendo los cuerpos multivesiculares, los cuales se organizan en gránulos del vitelo (Carnevali *et al.*, 2006; Hiramatsu *et al.*, 2002). Las VTGs endocitadas, sufren una primera proteólisis que resulta en las proteínas del vitelo (PVs) y que corresponden a lipovitelininas de cadena pesada y liviana (Hiramatsu *et al.*, 2002). Finalizada la etapa de crecimiento, los ovocitos experimentan su maduración final que se caracteriza por la reanudación de la meiosis posterior a un importante incremento de volumen inducido por un influjo de agua, en un proceso que se conoce como hidratación. Este proceso, se desarrolla de manera diferencial en especies con diferentes estrategias reproductivas, siendo de mayor intensidad en las especies pelágicas (como *S. lalandi*) que producen huevos y embriones con un alto nivel de flotabilidad (Fabra *et al.*, 2006).

Flotabilidad de los huevos y embriones de peces pelágicos

Los principales efectores osmóticos de la hidratación en los ovocitos de los peces son aminoácidos libres (AALs) derivados de la proteólisis de las PVs, de manera que al aumentar la concentración de estos, se favorece el ingreso de agua en los ovocitos maduros (Cerdà, 2001). Existen evidencias que indican que la hidrólisis de las PVs está correlacionada con el grado de hidratación del ovocito, siendo más intensa en las especies pelágicas que en las bentónicas (Sundby y Kristiansen, 2015; Sawaguchi *et al.*, 2006). En

Anguilla japonica (un reproductor pelágico), se observó un menor contenido de AALs y agua en los huevos no flotantes en comparación con los huevos de flotación normal (Seoka *et al.*, 2003). En *S. aurata*, la inhibición de la hidrólisis de las PVs durante la maduración *in vitro* bloqueó la producción de AALs y redujo significativamente el nivel de hidratación (Fabra *et al.*, 2006). En estudios desarrollados recientemente en *S. lalandi* se demostró un mayor contenido de AALs en embriones tempranos flotantes en comparación a aquellos con baja (Palomino *et al.*, 2017c).

La adquisición de flotabilidad representa uno de los factores limitantes en la reproducción de las especies pelágicas. De hecho, bajo condiciones controladas, casi la mitad de los huevos se hunden y no son viables. Entre las posibles causas de esta pérdida de flotabilidad, se ha propuesto la participación del mecanismo de apoptosis celular, la cual estaría determinada desde la formación del ovocito en el ovario (Gómez, 2018; Palomino *et al.*, 2017b; 2016; Carnevali *et al.*, 2003).

Apoptosis: regulación y relación con la flotabilidad de los huevos y embriones

La apoptosis o muerte celular programada ocurre normalmente durante el desarrollo, envejecimiento y como un mecanismo homeostático para mantener la población celular en un tejido. Durante este proceso, ocurren cambios bioquímicos y morfológicos, tales como: 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). Las señales que desencadenan la apoptosis incluyen, daño celular causado por condiciones estresoras o señales extracelulares. Los mecanismos de acción de los agentes apoptóticos, tanto intracelulares como extracelulares, convergen para activar un grupo de proteasas específicas denominadas caspasas, que existen como zimógenos inactivos en las células vivas y son activados a través de procesamiento proteolítico (Thornberry y Lazebnik, 1998). Se han descrito dos vías principales que conllevan a la apoptosis celular, la vía intrínseca o mitocondrial y la extrínseca o del receptor de muerte. La vía extrínseca requiere la unión de un ligando de muerte (FasL) a su receptor específico (Fas) en la superficie celular. Este complejo ligandoreceptor recluta factores citosólicos como el dominio de muerte asociado a Fas (FADD) y la caspasa-8, la cual hidroliza a la pro-caspasa-3, activándola a Caspasa 3 que es una enzima efectora de los procesos que caracterizan la muerte celular programada (Rojas

et al., 2009). 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 (Bcl2), 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 proapoptóticas como: Bax, Bak, Bok, Bim y Bid (Rojas *et al.*, 2009).

En los peces, se ha demostrado que la apoptosis se produce en el ovario y que puede ser un factor importante en el control de la atresia folicular (Morais *et al.*, 2016; Takle y Andersen, 2007). En el pez tropical *Prochilodus argenteus*, se evidenció una mayor actividad de Caspasa 3 y mayor cantidad de células apoptóticas reveladas mediante la técnica Tunel, en peces que fueron capturados en aguas con baja concentración de oxígeno. En estos peces se observó un gran deterioro en la foliculogénesis (Thomé *et al.*, 2012). En esta misma especie, se vio 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 (factor anti apoptótico) sería más intensa inmediatamente después del desove, para disminuir al día 2 y 3 posterior al desove (Morais *et al.*, 2016). En huevos de *Sparus aurata*, un pez 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.*, 2001), 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). En estudios recientes en *S. lalandi*, se ha demostrado la expresión de genes pro-apoptóticos de la vía intrínseca, tales como Bax y Caspasa 9 en diferentes etapas del desarrollo embrionario. Los niveles de ARNm de estos genes resultaron ser mayores en embriones no flotantes (en comparación a los flotantes) (Gómez, 2018; Palomino *et al.*, 2017b; 2016). De la misma manera, se describió una mayor expresión en

las muestras no flotantes, del ARNm que codifica para la enzima efectora de la apoptosis: la Caspasa 3 (Gómez, 2018). Estos antecedentes en peces pelágicos y específicamente los resultados previos en *S. lalandi*, han demostrado una relación entre la presencia de factores pro-apoptóticos y la menor flotabilidad de los huevos y embriones de esta especie. Sin embargo, no existen antecedentes referente a la participación de moléculas de la vía extrínseca en la pérdida de flotabilidad de los embriones tempranos de *S. lalandi*. Por lo tanto, en este trabajo se evaluará la expresión de moléculas importantes de la vía extrínseca como el sistema Fas/Fas-L y Caspasa 8, a través del desarrollo temprano de *S. lalandi*, en embriones flotantes y no flotantes. Además, con el propósito de demostrar la homogeneidad estructural y funcional entre embriones flotantes y no flotantes, se analizará la actividad transcripcional mediante análisis de expresión de 4 genes regularmente utilizados como genes constitutivos en estudios de expresión génica.

HIPÓTESIS

La pérdida de flotabilidad de los huevos y embriones tempranos de *Seriola lalandi* está relacionada con el mecanismo de apoptosis celular, por lo tanto moléculas asociadas a la vía extrínica de este proceso, como el sistema Fas/Fas-L y Caspasa 8, presentarán mayores niveles de expresión en embriones no flotantes en comparación con los flotantes.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la flotabilidad de los huevos y embriones tempranos de *S. lalandi* en la expresión de moléculas asociadas a la vía extrínica de la apoptosis.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Determinar la participación del sistema Fas/FasL en la apoptosis de huevos y embriones tempranos de *S. lalandi*, mediante la evaluación de sus niveles de expresión a través del desarrollo en embriones con diferente nivel de flotabilidad.

- 2- Evaluar la participación Caspasa 8 en la apoptosis de huevos y embriones tempranos de *S. lalandi*, mediante la evaluación de sus niveles de expresión de ARNm a través del desarrollo, en embriones con diferente nivel de flotabilidad.

- 3- Determinar la viabilidad funcional en embriones flotantes y no flotantes de *S. lalandi*, mediante análisis comparativo de la actividad transcripcional.

MATERIALES Y MÉTODOS

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

1. Obtención de las muestras

Las muestras fueron proporcionadas por Acuícola del Norte S.A, empresa ubicada en la ciudad de Caldera en la Región de Atacama. La empresa cuenta con cuatro estanques de 85.000 litros asociados a un sistema de recirculación con agua de mar que fluctúa entre los 17 y 23 °C. El manejo de la temperatura y fotoperíodo le ha permitido a este centro de cultivo obtener desoves regulares en diferentes épocas del año. Cada estanque contiene aproximadamente 20 reproductores con una proporción de hembras:macho de 1:3. Durante tres eventos de desove, se colectaron aproximadamente 50 embriones en diferentes etapas del desarrollo, según lo descrito por Morán *et al.*, (2007) y Palomino *et al.*, (2017a). Estas etapas correspondieron a: huevo (H), mórula (M), blástula (B), gástrula (G) y embriones de 24 horas (E), los cuales se obtuvieron desde 30 minutos, 4, 12, 18 y 24 horas de iniciado el desove, respectivamente. Las muestras fueron trasladadas a un frasco colector de 4 litros de forma cónica e invertido, donde permanecieron por 10 minutos. Las muestras flotantes fueron extraídas desde la superficie del colector utilizando una malla de plancton, mientras que aquellas con menor nivel de flotabilidad fueron colectados desde el fondo del frasco, eliminando 1 Litro de agua a través de una llave. En cada muestreo, una submuestra de aproximadamente 20 individuos se analizó bajo un microscopio de contraste de fases, con el fin de comprobar el estadio del desarrollo correspondiente al tiempo de seguimiento desde la detección del inicio del desove. Sólo se utilizaron aquellas muestras con más del 80% de los embriones en un mismo estadio del desarrollo. Las muestras fueron mantenidas en RNAlater® *Solution* (Ambion®) o almacenadas a -20°C, para su transporte a Santiago.

2. Análisis del Sistema Fas/FasL mediante *Western Blot*

Para evaluar la expresión proteica del Sistema Fas/FasL en las diferentes etapas del desarrollo de *S. lalandi* y en función de la flotabilidad, se extrajeron las proteínas totales de cada estadio flotante y no flotantes, utilizando el buffer de *lysis RIPA* (*Thermo*)

suplementado con un cocktail inhibidor de proteasas y fosfatasa (*ThermoFisher*). La concentración proteica se determinó mediante fluorimetría a través del *kit Qubit Protein Assay (Molecular Probes®)*. Las proteínas (80 µg) se separaron mediante electroforesis en geles de SDS-Poliacrilamida al 12% (*Express Plus PAGE-Gels, GeneScrip*), utilizando una cámara *Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad)*. Las proteínas fueron transferidas a membranas de Polivinilideno difluoruro (PVDF), las cuales se incubaron con el anticuerpo Anti Fas de ratón preparado en conejo (SC-1023, Santa Cruz *Biotechnology*) o el anticuerpo Anti FasL de rata preparado en ratón (MAB1858, *R&D Systems*) en una concentración de 1/100 cada uno. Se consideraron controles específicos de reacción saturando los anticuerpos con los respectivos péptidos y controles de carga utilizando el anticuerpo Anti beta actina (ab8226, *Abcam*). Posteriormente, las membranas se incubaron con los segundos anticuerpos anti IgG de ratón (ab6790) y de conejo (ab97048) conjugados con fosfatasa alcalina. Las bandas se visualizaron con el sustrato NBT/BCIP (SC-24981, Santa Cruz *Biotechnology*). La intensidad de las bandas se evaluó con el programa *BIOTOP Gel Imaging System (Bio-Tech Co., Ltd, China)*.

3. Estudios por RT-qPCR

En este trabajo se utilizó la técnica de RT-qPCR para evaluar la expresión relativa del ARNm que codifica para Caspasa 8 y comparar la actividad transcripcional entre los embriones flotantes y no flotantes mediante el análisis de 4 genes constitutivos.

3.1 Extracción de ARN y transcripción reversa

El ARN fue extraído con el Kit de Purificación *GeneJET™ RNA (Thermo)*. La concentración de ARN total se cuantificó mediante fluorimetría utilizando el *Kit Qubit® RNA Assay (Molecular Probes®)* y el equipo *Qubit® Fluorometer (Invitrogen™)*. Las muestras se almacenaron a -80°C. La transcripción reversa (RT) se desarrolló con el conjugado enzimático *SuperScript™ First-Strand Synthesis System (Invitrogen™)*, el cual incluyó un tratamiento inicial con DNasa I. La concentración del ADN complementario (ADNc) se determinó utilizando el Kit de cuantificación *Qubit® ssDNA Assay (Molecular Probes®)*. El ADNc se almacenó a -20°.

3.2 Diseño y evaluación de partidores

Los partidores para Caspasa 8 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 (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 de 20 bp. Además, los partidores fueron evaluados a través de software NetPrimer, evitando la existencia de horquillas, dímeros y repeticiones de base. Una vez escogido el juego de partidores (Tabla 1), se realizó una curva de calibración con distintas concentraciones de ADNc, con el fin de obtener el valor de eficiencia (E). Estas evaluaciones, se desarrollaron con ADNc obtenido de ovario en investigaciones previas. Además, se utilizaron partidores para los genes constitutivos beta actina (*ACTB*) y proteína asociada a microtúbulo 1 β (*MAP1 β*), los cuales se utilizaron para el cálculo de la expresión relativa de Caspasa 8. Estos genes fueron validados como genes de referencia en trabajos anteriores (Gómez, 2018; Rodríguez, 2017; Palomino *et al.*, 2017a; 2014; Herrera, 2013). Además, se utilizaron partidores para otros 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. Los partidores y sus características son mostrados en la Tabla 1.

3.3 qPCR y cálculo de expresión relativa

Las amplificaciones fueron realizadas en triplicado con un termociclador Illumina® *Eco Real Time PCR System* EC-100-1001 utilizando el *Kit Máxima SYBR Green qPCR Master Mix* (Thermo). Se evaluó la expresión relativa de Caspasa 8 en huevos y embriones tempranos de *S. lalandi* flotantes y no flotantes registrando los valores Ct, los cuales fueron transformados en valores relativos denominados *Quantity* (Q) a través del Método $\Delta\Delta Ct$ (Pfaffl, 2004; Vandesompele *et al.*, 2002). La expresión relativa en cada estadio del desarrollo fue estimada como el cociente entre el valor Q del gen objetivo y un Factor de Normalización (FN), el cual se calculó en base a la media geométrica de los Q de los genes de referencia. Cada qPCR consideró controles sin templado y sin partidores.

3.4 Expresión de genes constitutivos

Con el objetivo de evaluar y comparar de forma indirecta la viabilidad funcional entre las muestras flotantes y no flotantes en cada uno de los estadios del desarrollo evaluados en este trabajo, en cada réplica biológica se evaluó la expresión de ACTB, MAP1 β , GAPDH y 18S en base a los valores de ciclo umbrales (Ct).

4. Análisis estadístico

Se evaluaron 3 réplicas biológicas, correspondientes a ARNm y proteína de 3 eventos de desoves. En los experimentos de RT-qPCR, se desarrollaron 3 réplicas técnicas, las cuales fueron evaluadas en triplicado. El modelo estadístico fue el siguiente:

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

Y_{ijk} = Expresión relativa promedio de Caspasa 8 o intensidad de bandas de Fas/Fas-L.

μ = Media poblacional. τ_i = Efecto del estadio i del desarrollo embrionario ($i= 1-5$).

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

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

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

La intensidad de banda en western blot (para Fas y FasL), la expresión relativa de Caspasa 8 y el promedio de Cts de ACTB, MAP1 β , GAPDH y 18S, se expresaron como el promedio \pm la desviación estándar en donde los datos se analizaron por ANDEVA con el Programa InfoStat, versión 2004; Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Las diferencias significativas entre promedios fueron evaluadas usando la prueba de Tukey, con un valor de $P < 0,05$.

RESULTADOS

1. Expresión del Sistema Fas/FasL

El sistema Fas/FasL pudo ser detectado durante el desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi*. Los anticuerpos Anti Fas (SC-1023) y Anti FasL (MAB1858), resultaron específicos para la detección de estas proteínas en *S. lalandi* dado que la pre-incubación de éstos con sus respectivos péptidos no permitió la visualización de ninguna banda reactiva. La expresión de estas proteínas presentó algunas diferencias entre embriones flotantes y no flotantes y a través del desarrollo. La proteína Fas se detectó como una fuerte banda de 50 kDa en las muestras flotantes en todas las etapas del desarrollo (Figura 1A). Esta banda, no presentó diferencias ($p < 0,05$) en su intensidad a través del desarrollo (Figura 1B). En los embriones no flotantes en cambio, se detectaron tres bandas reactivas con el anticuerpo anti Fas, con pesos moleculares de 65, 50 y 40 kDa (Figura 2A). La banda de 50 kDa fue la que se detectó con mayor intensidad en todos los estadios analizados. La intensidad encontrada en las bandas de 65 y 50 kDa no varió en forma significativa durante los primeros cuatro estadios y sólo se encontró una ($p < 0,05$) mayor reactividad en los embriones de 24 horas en comparación a lo observado en los huevos (Figura 2B). Además, la intensidad de estas bandas en los estados de mórula, blastula y gástrula fue similar a la detectada en los embriones de 24 horas. Por su parte, la intensidad de la banda de 40 kDa no varió en los primeros cuatro estadios en las muestras no flotantes. La intensidad de esta banda, fue similar en blástulas, gástrulas y embriones de 24 horas (Figura 2B).

Por otro lado, la proteína FasL no se expresó en los primeros cuatro estadios embrionarios en las muestras flotantes y sólo una débil banda de 44 kDa se pudo detectar en los embriones de 24 horas (Figuras 3A y B). Sin embargo, en las muestras no flotantes el anticuerpo anti Fas-L reconoció una banda de 44 kDa, la cual aumentó ($p < 0,05$) progresivamente en intensidad en la medida que avanzó el desarrollo embrionario (Figuras 4A y B).

2. Estudios por RT-qPCR

2.1 Condiciones de PCR para los primers de Caspasa 8

La amplificación específica del *set* de primers para Caspasa 8 fue determinada mediante el análisis de las curvas de fusión (curvas de Melt) en donde se pudo observar un único *peak* y ausencia de amplificación en los blancos sin partidor y sin templado (Figura 5). Además, el análisis de las curvas de calibrado reveló un valor de eficiencia de este set de *primers* de 1,98 (Tabla 1).

2.2 Expresión relativa de Caspasa-8

EL ARN mensajero que codifica para la Caspasa 8 se expresó en todas las etapas del desarrollo embrionario evaluadas en este trabajo, tanto en las muestras flotantes, como en las no flotantes. En los embriones flotantes los niveles de ARNm no presentaron variaciones hasta el estadio de gástrula. Sin embargo, un significativo aumento de este gen ($p < 0,05$) se observó en los embriones de 24 horas (Figura 6). En los embriones no flotantes en cambio, los niveles de Caspasa 8 se mantuvieron constantes hasta el estadio de blástula y se evidenció una mayor ($p < 0,05$) expresión en los estadios de gástrula y embrión de 24 horas (24H) (Figura 6). Finalmente, la expresión relativa de Caspasa-8 fue mayor en las muestras no flotantes en todos los estadios del desarrollo evaluados (Figura 6).

2.3 Evaluación de la actividad transcripcional

El análisis de actividad transcripcional a través de la expresión de los genes constitutivos ACT β , MAP1 β , GAPDH y 18S demostró que estos genes presentan diferentes valores promedio de Cts entre las muestras analizadas. Esto, representaría niveles altos para 18S, medios para MAP1B y ACTB y bajos para GAPDH. Sin embargo, independiente del valor promedio de Ct de cada gen, en este trabajo se pudo verificar que en ningún estadio se observaron diferencias significativas en el valor de Ct de estos genes constitutivos, entre embriones flotantes y no flotantes (Figura 7).

DISCUSIÓN

En este trabajo se logró detectar durante el desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi*, proteínas y ARNs mensajeros de factores que participan en la vía extrínseca de la apoptosis celular. Los patrones de expresión de éstas moléculas a través del desarrollo y según la condición de flotabilidad de las muestras, permiten relacionar la pérdida de flotabilidad de los huevos y embriones tempranos de esta especie, con el mecanismo de apoptosis celular. Además, la presencia del sistema Fas/FasL y Caspasa 8 en los embriones flotantes, que son considerados de buena calidad y con mejores expectativas de sobrevivencia, indicaría que la apoptosis celular es un proceso que se lleva a cabo con normalidad durante el desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi*. Estos resultados, permiten complementar reportes previos en esta especie, en donde se demostró, en muestras similares a las de este trabajo, la expresión del ARNm de moléculas de la vía intrínseca de la apoptosis tales como Bax y Caspasa 9, así como la enzima efectora de este proceso; la Caspasa 3 (Gómez, 2018; Palomino *et al.*, 2017b; 2016). Por otro lado, la detección de éstas moléculas en el desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi* concuerda con lo observado en diferentes especies de vertebrados e invertebrados (AnvariFar *et al.*, 2017; Agnello *et al.*, 2015; Moya *et al.*, 2016; Peñaloza *et al.*, 2006), en donde se ha propuesto que el proceso de muerte celular programada es esencial en la remoción del excesivo número de células que comúnmente se producen durante el desarrollo (Elmore, 2007). Específicamente en peces, estudios desarrollados principalmente en pez cebra han determinado que el proceso de apoptosis participa en la morfogénesis del sistema nervioso y de órganos sensoriales (Uchida *et al.*, 2002; Cole y Ross 2001).

La hipótesis propuesta en este trabajo se fundamenta en la elevada mortalidad que normalmente se observa en los centros de producción de juveniles de especies pelágicas como *S. lalandi*. Esto, ha llevado a diferentes autores a cuestionar y discutir el fundamento biológico por el cual estos peces producen una cantidad tan grande de células germinales, en circunstancias que muchas de ellas entran en apoptosis durante el desarrollo folicular (Andreu-Vieyra y Habibi, 2000) y después de la fecundación durante el desarrollo temprano (Carnevali *et al.*, 2003). En *S. lalandi*, así como en otros peces pelágicos se ha visto que sólo aquellos huevos que presentan flotabilidad positiva, continúan de forma exitosa el desarrollo embrionario temprano, siempre y cuando el nivel de flotabilidad de

estos embriones se mantenga en el tiempo (Carnevali *et al.*, 2003; 2001; Poortenaar *et al.*, 2001). Estas observaciones han servido de fundamento para proponer que en estas especies, no todos los ovocitos son formados en el ovario de la misma forma, de tal modo que algunos de ellos mueren durante el desarrollo folicular y un número importante lo haría una vez desovados o incluso después de iniciado el desarrollo embrionario (Sundby y Kristiansen, 2015; Carnevali *et al.*, 2003).

En nuestro modelo de estudio, que incluyó huevos y embriones tempranos de *S. lalandi* clasificados según su nivel de flotabilidad, resultó evidente que el programa de muerte celular programada incluye moléculas de la vía extrínseca como el sistema Fas/FasL. Esto resultó más evidente en las muestras no flotantes, las cuales expresaron de manera simultánea ambas proteínas. Este hecho, se ha propuesto como una característica propia de las células pre-apoptóticas y ha sido descrito durante el desarrollo temprano en ratas y humanos hasta los estados de blastocisto y mórula, respectivamente (Kawamura *et al.*, 2003). En peces, existe sólo una referencia en el pez pelágico *S. aurata*, en donde también se observó en huevos no flotantes la presencia del receptor Fas y su ligando FasL (Carnevali *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos mediante western blot en los huevos y embriones de *S. lalandi*, revelaron sólo una proteína reactiva (50 kDa) para el receptor Fas en las muestras flotantes y tres bandas reactivas (65, 50 y 40 kDa) en las muestras no flotantes. Un resultado similar fue descrito en *S. aurata*, en donde se utilizó el mismo anticuerpo de este trabajo y se encontró también una sola banda proteica de 50 kDa en las muestras flotantes y dos isoformas (50 y 45 kDa) en las muestras no flotantes (Carnevali *et al.*, 2003). Por otro lado, en este trabajo se encontraron diferencias en los perfiles de expresión de Fas entre las muestras flotantes y no flotantes, a través del desarrollo embrionario. Mientras que en los embriones flotantes la intensidad de la banda se mantuvo constante, en las muestras no flotantes se detectó un aumento en la expresión de las tres bandas reactivas para Fas en etapas avanzadas del desarrollo (gástrulas y embriones de 24 horas). Aunque el aumento de la expresión de esta proteína a medida que avanza el desarrollo ha sido demostrada en modelos de mamíferos (Budisova-Svandova *et al.*, 2017), los resultados obtenidos en este trabajo y los mencionados en *S. aurata*, despiertan una serie de interrogantes referente a las características moleculares de Fas, su rol biológico y las diferencias en su participación en la apoptosis celular de huevos y embriones de peces pelágicos. Por lo tanto, estos resultados representan una línea de base para futuros estudios

relacionados con la activación de este receptor, así como las propiedades moleculares de las tres isoformas encontradas en nuestro trabajo y las dos descritas en *S. aurata*. En este sentido, será fundamental complementar el estudio de esta proteína, con análisis a nivel transcriptómico especie-específico que permita evaluar su expresión desde la formación del ovocito en el ovario hasta el desarrollo embrionario temprano.

Por otro lado, la viabilidad potencial que generalmente se le atribuye a los huevos y embriones tempranos flotantes de peces pelágicos, concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo, en donde el ligando de Fas (FasL) sólo fue visualizado en embriones de 24 horas. El ligando FasL, tampoco fue detectado en huevos flotantes de *S. aurata* (Carnevali *et al.*, 2003). Esto, indicaría que estos huevos y embriones, no están en un estado preapoptótico, como ha sido descrito en diferentes sistemas en vertebrados (Inoue *et al.*, 2006; Ricchiari *et al.*, 2003; Kawamura *et al.*, 2003). Sin embargo, estos embriones flotantes presentan la maquinaria para el inicio del proceso de muerte celular mediante moléculas de la vía extrínseca, la cual se activaría por algún mecanismo de inducción no revelado hasta la fecha. En las muestras no flotantes en cambio, si fue posible detectar FasL en una banda de 44 kDa que aumentó progresivamente su intensidad con el desarrollo, especialmente en los embriones de 24 horas. La detección de FasL en huevos no flotantes también fue reportada en *S. aurata* por Carnevali *et al.*, (2003). Según lo discutido por estos autores y que también puede ser considerado en nuestro modelo, la naturaleza del FasL detectado en los huevos de *S. aurata* puede tener diferentes orígenes. La opción más probable, en función de los antecedentes bibliográficos, es que FasL provenga desde la formación del ovocito en el ovario y que por algún mecanismo desconocido aún, no provocó la cascada de señales para la apoptosis del ovocito en el folículo. Esto, se basa en la creciente disponibilidad de antecedentes relativos a la participación de la apoptosis en la atresia folicular en peces teleosteos (Thome *et al.*, 2012; Krisko *et al.*, 2008; Ricchiari *et al.*, 2003; Drummond *et al.*, 2000). También se ha planteado la posibilidad de que el receptor Fas en los peces, no se acople con una proteína tipo FasL como se ha descrito en embriones tempranos de mamíferos, sino con macromoléculas similares a este ligando presentes en el agua de mar, las cuales aún no han sido identificadas, pero que tendrían una estructura molecular similar al FasL de los vertebrados.

Por otro lado, en este trabajo logramos describir antecedentes adicionales que apoyan la participación del mecanismo extrínseco de la apoptosis celular en la pérdida de flotabilidad

de los embriones tempranos de *S. lalandi*. De este modo, confirmamos la expresión del ARNm que codifica para Caspasa 8, una enzima de la vía extrínseca que participa en la activación de la Caspasa 3, la enzima efectora final de esta cascada de reacciones (Rojas *et al.*, 2009). Diferentes estudios han revelado el status conservado de los mecanismos de apoptosis que involucran la participación de las Caspasas entre los vertebrados (Sakamaki y Satou, 2009). Específicamente para Caspasa 8, se ha comprobado que el gen *casp8* del pez cebra tiene una organización genómica similar a genes *casp8* descritos en diferentes especies de mamíferos (Sakata *et al.*, 2007). Además, estos autores desarrollaron estudios funcionales con la proteína Caspasa 8 en células de mamíferos y vieron que esta proteína es capaz de transmitir señales apoptóticas no sólo a través de la vía mediada por el receptor Fas, sino a través del receptor TNF en células transgénicas de ratón deficientes en *casp8*. El perfil de expresión de Caspasa 8 encontrado durante el desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi*, es similar al perfil de expresión descrito en el desarrollo del pez cebra, donde Caspasa 8 se describe como un gen materno que se mantiene a través de la embriogénesis y los primeros estadios larvales (Sakata *et al.*, 2007). Considerando la información disponible relativa a la expresión de genes durante el desarrollo embrionario en vertebrados, se puede concluir que el aumento significativo de la expresión del ARNm que codifica para Caspasa8 en gástrulas y embriones de 24 horas (sin importar el nivel de flotabilidad) de *S. lalandi*, se debería a una mezcla de genes maternos y el inicio de la transcripción propia del embrión en una etapa del desarrollo que se conoce como el periodo de transición de blástula media (Miccoli *et al.*, 2015). Entre estos genes, se encontrarían genes que participan en la apoptosis celular. De hecho, en estudios previos en *S. lalandi* se describió un perfil similar de expresión de genes de la vía intrínseca como Bax, Bcl-2 y Caspasa 9 (Gómez, 2008; Palomino *et al.*, 2017b; 2016).

Por lo tanto, los resultados de este trabajo confirman la presencia de moléculas asociadas a la vía extrínseca de la apoptosis durante el desarrollo temprano de *S. lalandi*. Los perfiles de expresión de las proteínas Fas/FasL y el ARNm de Caspasa 8 en relación a la flotabilidad de los embriones, permiten suponer la participación del mecanismo de apoptosis mediado por estímulos externos, así como se han sugerido también los mecanismos intrínsecos (Gómez, 2018). Sin embargo, para comprender de mejor manera el mecanismo extrínseco, su vía de activación y la asociación con la pérdida de flotabilidad de los huevos y embriones tempranos en *S. lalandi*, es necesario profundizar su estudio desde

la formación del ovocito en el ovario mediante técnicas moleculares especie específicas como el secuenciamiento masivo del ARN.

Una duda razonable en el modelo de evaluación de moléculas apoptóticas propuesto en este trabajo, se relaciona con las eventuales diferencias funcionales entre las muestras flotantes y no flotantes que pudiesen ser determinantes en los resultados de este trabajo. El estudio comparativo de expresión de los genes constitutivos (ACTB, MAP1B, GAPDH y 18S) mostró que no existen diferencias en la transcripción entre muestras flotantes y no flotantes, ni a través del desarrollo. En el pez pelágico *S. aurata* se han descrito diferencias entre huevos flotantes y no flotantes que van desde aspectos morfológicos de la membrana vitelina, a diferencias en la capacidad de transcripción y traducción. Sin embargo, a pesar de existir estas diferencias, funciones básicas como la capacidad de ser fecundados, no se ven afectadas (Carnevali *et al.*, 2001). El análisis de diferentes aspectos morfológicos y funcionales, como los desarrollados en *S. aurata*, entre los embriones flotantes y no flotantes de *S. lalandi*, nos entregará mejores herramientas para interpretar de manera más certera el significado de las diferencias en los niveles de expresión de moléculas apoptóticas descritos en este trabajo y en estudios anteriores en *S. lalandi*.

CONCLUSIONES

-Moléculas asociadas a la vía extrínseca de la apoptosis como el sistema Fas/Fas-L y Caspasa 8 se expresan durante el desarrollo embrionario temprano de *Seriola lalandi*. Los patrones de expresión de estas moléculas en embriones no flotantes sugieren una pre-activación de la vía extrínseca de la apoptosis en estas muestras.

-No existen diferencias a nivel transcripcional entre embriones tempranos de *S. lalandi*, lo que sugiere una similitud funcional entre estas muestras.

BIBLIOGRAFÍA

AGNELLO, M.; BOSCO, L.; CHIARELLI, R.; MARTINO, C.; ROCCHERI, M. C. 2015. The role of autophagy and apoptosis during embryo development. In ‘Cell Death – Autophagy, apoptosis and necrosis’. Ed. T. Ntuli. pp. 83–112.

ANDREU-VIEYRA, C.V.; HABIBI, H.R. 2000. Factors controlling ovarian apoptosis. *Can J Physiol Pharmacol* 78:1003-1012.

ANVARIFAR, H.; AMIRKOLAIE, AK.; MIANDARE, HK.; OURAJI, H.; JALALI, MA.; UCUNCU, SI. 2017. Apoptosis in fish: environmental factors and programmed cell death. *Cell Tissue Res* 368:425-439.

BUDISOVA-SVANDOVA, E.; VESELA, B.; LESOT, H.; POLIARD, A.; MATALOVA, E. 2017. Expression of Fas, FasL, caspase 8 and other factors of the extrinsic apoptotic pathway during the onset of interdigital tissue elimination. *Histochem Cell Biol* 147:497–510.

CARNEVALI, O.; MOSCONI, G.; CARDINALI, M.; MEIRI, I.; POLZONETTI-MAGNI, A. 2001. 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 *Sparus aurata* 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 Endocrinol* 146: 195–203.

CERDÀ, J. 2001. Mecanismos fisiológicos durante la hidratación del huevo de teleósteos: hacia el desarrollo de nuevos métodos de criopreservación. *Bol Inst Oceanogr* 18:145-152.

COLE, L.; ROSS, L. 2001. Apoptosis in the developing zebrafish embryo. *Dev Biol* 240:123-142.

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

DRUMMOND, C.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E.; SATO, Y. 2000. Postovulatory follicle: a model for experimental studies of programmed cell death or apoptosis in teleost. *J Exp Zool* 287:176-182.

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.

GÓMEZ, C. 2018. Factores apoptóticos involucrados en la flotabilidad en huevos y embriones tempranos del pez dorado *Seriola lalandi*. Memoria para optar al título de Médico Veterinario. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile. 34 pp.

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 pp.

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

INOUE, N.; MAEDA, A.; MATSUDA-MINEHATA, F.; FUKUTA, K.; MANABE, N. 2006. Expression and localization of Fas ligand and Fas during atresia in porcine ovarian follicles. J Reprod Dev 52:723-30.

JAYAKIRAN, M. 2015. Apoptosis-Biochemistry: A Mini Review. J Clin Exp Pathol 5:1.

KAWAMURA, K.; SATO, N.; FUKUDA, J.; KODAMA, H.; KUMAGAI, J.; TANIKAWA, H.; SHIMIZU, Y.; TANAKA T. 2003. Survivin acts as an antiapoptotic factor during the development of mouse preimplantation embryos. Dev Biol 256:331-341.

KAWAMURA, K.; FUKUDA, J.; KODAMA, H.; KUMAGAI, J.; KUMAGAI, A.; TANAKA, T. 2001. Expression of Fas and Fas ligand mRNA in rat and human preimplantation embryos. Mol Hum Reprod 7:431-436.

KRYSKO, D.V.; DIEZ-FRAILE, A.; CRIEL, G.; SVISTUNOV, A.A.; VANDENABEELE, P. 2008. Life and death of female gametes during oogenesis and folliculogenesis. Apoptosis 13:1065–1087.

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.

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.

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.

MOYA, A.; SAKAMAKI, K.; MASON, B.; HUISMAN, L.; FORÊT, S.; MILLER, D. 2016. Functional conservation of the apoptotic machinery from coral to man: the diverse and complex Bcl-2 and caspase repertoires of *Acropora millepora*. *BMC Genomics* 17:62.

NAKADA, M. 2008. Capture-based aquaculture of yellowtail. In A. Lovatelli; P.F. Holthuis (eds). *Capture-based aquaculture. Global overview.* FAO Fisheries Technical Paper. No. 508. Rome, FAO. pp. 199–215.

PALOMINO, J.; HERRERA, G.; DETTLEF, P.; PATEL, A.; TORRES-FUENTES, J.L.; MARTÍNEZ, V. 2017a. Assessment of cathepsin mRNA expression and enzymatic activity during early embryonic development in the yellowtail kingfish *Seriola lalandi*. *Anim Reprod Sci* 180:23-29.

PALOMINO, J.; DE LOS REYES, M.; GÓMEZ-PÉREZ, C.; DETTLEFF, P.; BRAVO, C. 2017b. Assessment of *BAX* and *BCL2* mRNA expression in *Seriola lalandi* early embryos with different buoyancy levels. 50th SSR Annual Meeting, 13–16 July 2017, in Washington, D.C. USA.

PALOMINO, J.; HERNÁNDEZ, E.; DETTLEFF, P. 2017c. Aminoácidos libres en embriones tempranos de *Seriola lalandi* con diferente nivel de flotabilidad. VI Congreso Nacional de Acuicultura. Viña del Mar, Chile. 17-20 Enero.

PALOMINO, J.; GÓMEZ-PÉREZ, C.; DETTLEFF, P.; HERNÁNDEZ, E. 2016. Apoptotic factor related with buoyancy capacity in early embryos of yellow-tail kingfish *Seriola lalandi*. 49th SSR Annual Meeting, 16–20 July, San Diego, California, USA.

PALOMINO, J.; HERRERA, G.; DETTLEFF, P.; MARTÍNEZ, V. 2014. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 expression in previtellogenic oocytes and during early embryonic development of Yellow-tail Kingfish *Seriola lalandi*. *Biological Research* 47:60.

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 qPCR* 3:87-112.

POORTERNAAR, C.; HOOKER, S.; SHARP, N. 2001. Assessment of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) reproductive physiology, as a basic for aquaculture development. *Aquaculture* 201:271-286.

RICCHIARI, L.; D'ONGHIA, B.; LIGUORO, A.; TAMMARO, S.; MOTTA, C.M.; FILOSA, S.; ANDREUCETTI, P.; PRISCO, M. 2003. Role of Apoptosis and Fas/FasL System in the Oogenesis of the Spotted Ray *Torpedo marmorata*. *Mol Reprod Dev* 66:54–59.

RODRÍGUEZ, J. 2017. Expresión de enzimas asociadas la adquisición de flotabilidad en huevos y embriones tempranos del pez dorado *Seriola lalandi*. Memoria para optar al título de Médico Veterinario. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile. 28 pp.

ROJAS, M.; SALMEN, S.; BERRUETA, L. 2009. Muerte celular programada: I. Activación y mecanismos de regulación. *RMEP-ULA* 4:96-106.

SAWAGUCHI, S.; KAGAWA, H.; OHKUBO, N.; HIRAMATSU, N.; SULLIVAN, C.V.; MATSUBARA, T. 2006. Molecular characterization of three forms of vitellogenin and their yolk protein products during oocyte growth and maturation in red seabream (*Pagrus major*), a spawning pelagic eggs. *Mol Reprod Dev* 73:719-736.

SAKAMAKI, K.; SATOU, Y. 2009. Caspases: evolutionary aspects of their functions in vertebrates. *J Fish Biol* 74:727–753.

SAKATA, S.; YAN, Y.; SATOU, Y.; MOMOI, A.; SAKAMAKI, K. 2007. Conserved function of caspase-8 in apoptosis during bony fish evolution. *Gene* 396:134148.

SEOKA, M.; YAMADA, S.; IWATA, Y.; YANAGISAWA, T.; NAKAGAWA, T.; KUMAI, H. 2003. Differences in the biochemical content of buoyant and non-buoyant eggs of the Japanese eel, *A. japonica*. *Aquaculture* 216:355-362.

STUART, K.R.; DRAWBRIDGE, M.A. 2012. Captive spawning and larval rearing of California yellowtail (*Seriola lalandi*). *Aquaculture Res* 44:728-737.

SUNDBY, S.; KRISTIANSEN, T. 2015. The Principles of Buoyancy in Marine Fish Eggs and Their Vertical Distributions across the World Oceans. *PLoS ONE* 10(10): e0138821.

TAKLE, H.; ANDERSEN, O. 2007. Caspases and apoptosis in fish. *J Fish Biol* 71:326–349.

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.

THORNBERRY, NA.; LAZEBNIK, Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science* 281:1312-1316.

UCHIDA, D.; YAMASHITA, M.; KITANO, T.; IGUCHI, T. 2002. Oocyte apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testes during sex differentiation of juvenile zebrafish. *J Exp Biol* 205:711–718.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3:1-11.

Tabla 1: Gen, secuencia y eficiencia de los partidores para Caspasa 8 y genes constitutivos (Palomino *et al.*, 2017a; Herrera, 2013).

Gen	Secuencia Primer (5'-3')	Eficiencia
Casp8	F: CTGACACGAGGAGGAAGAGG R: ATTGGGCAGAAGACAAATCG	1.98
ACTB	F: AGGGAAATCGTGCGTGACAT R: GCTGAAGTTGTTGGGCCTTT	2.04
Map1b	F: TCATCAAGATTATCAGGAGGCG R: GGAAGCATACACCATGTAGAGG	1.98
GAPDH	F: CCCTTCATCGACCTGGAGTA R: GAGCAGAGGCCTTCTCAATG	1.99
18s	F: GCTCGTAGTTGGATCTCGGG R: GGTGAGGTTTCCCGTGTTGA	2.31

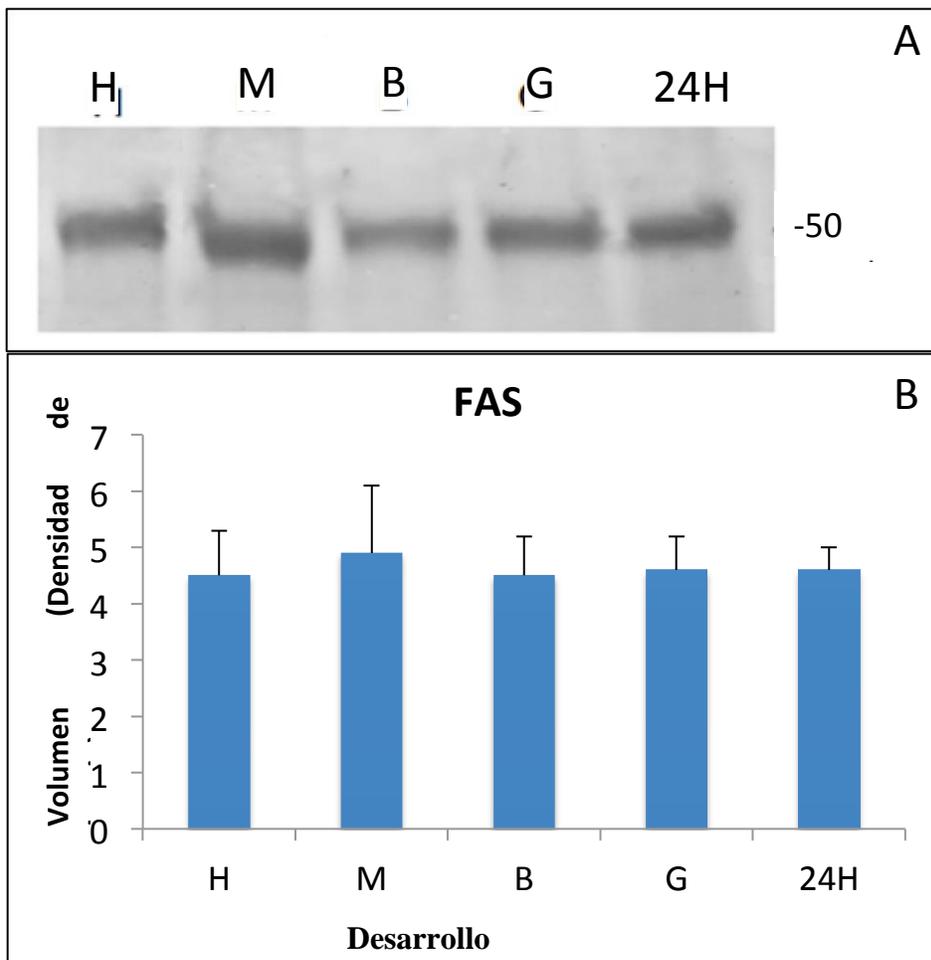


Figura 1: Análisis por *Western blot* de la proteína Fas durante el desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi*, en muestras flotantes. El anticuerpo Anti Fas (SC-1023) reconoció una banda reactiva de 50 kDa en todos los estadíos del desarrollo (A), la cual no presentó diferencias en la intensidad (B). Las barras representan la media \pm la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

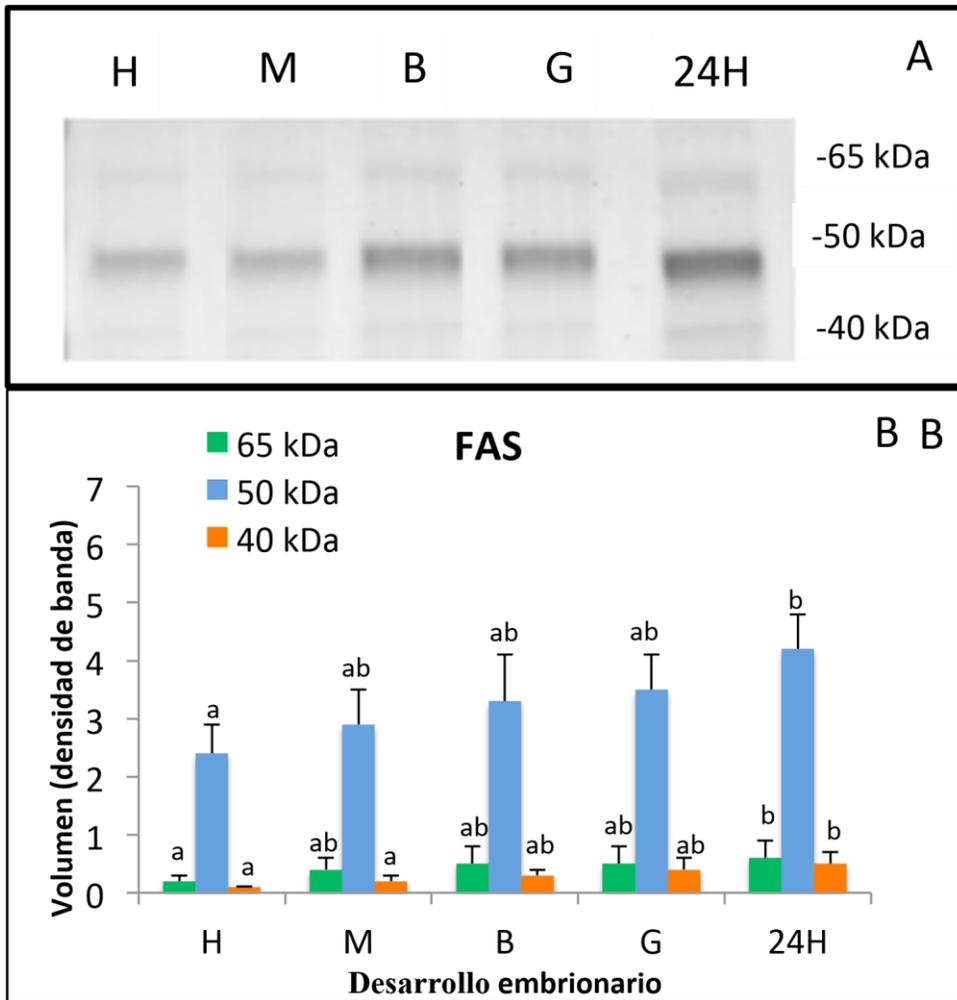


Figura 2: Análisis por *Western blot* de la proteína Fas durante el desarrollo embrionario de *S. lalandi*, en muestras no flotantes. El anticuerpo Anti Fas (SC-1023) reconoció tres bandas reactivas de 65 kDa (barras verdes), 50kDa (barras azules) y 40 KDa (barras naranjas) en todos los estadios del desarrollo (A), las cuales presentaron mayor intensidad en el estadio de embrión de 24horas (B). Las barras representan la media \pm la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a través del desarrollo para una misma banda ($p < 0,05$).

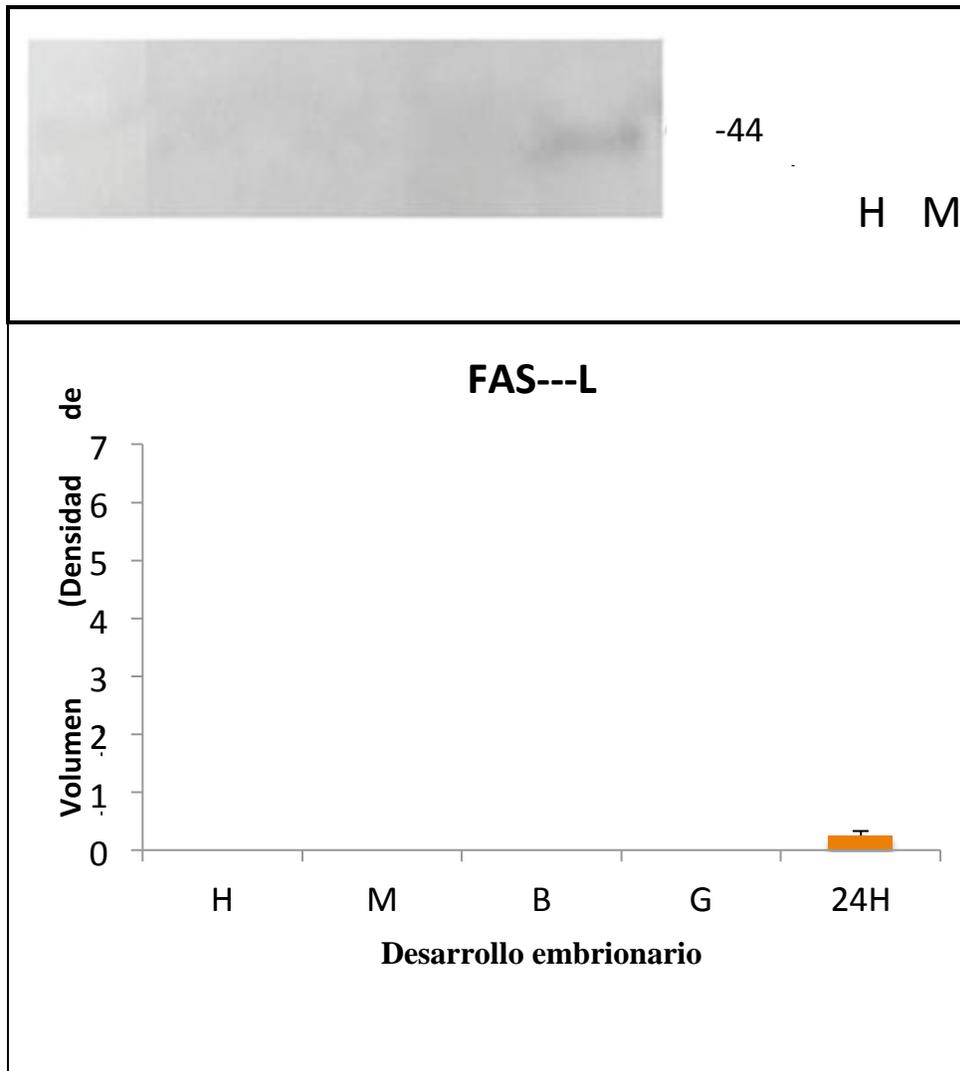


Figura 3: Análisis por *Western blot* de la proteína Fas-L durante el desarrollo embrionario de *S. lalandi*, en muestras flotantes. El anticuerpo Anti Fas-L (MAB1858) reconoció una débil banda reactiva de 44 kDa sólo en el estadio de embrión de 24 horas (A y B). Las barras representan la media \pm la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

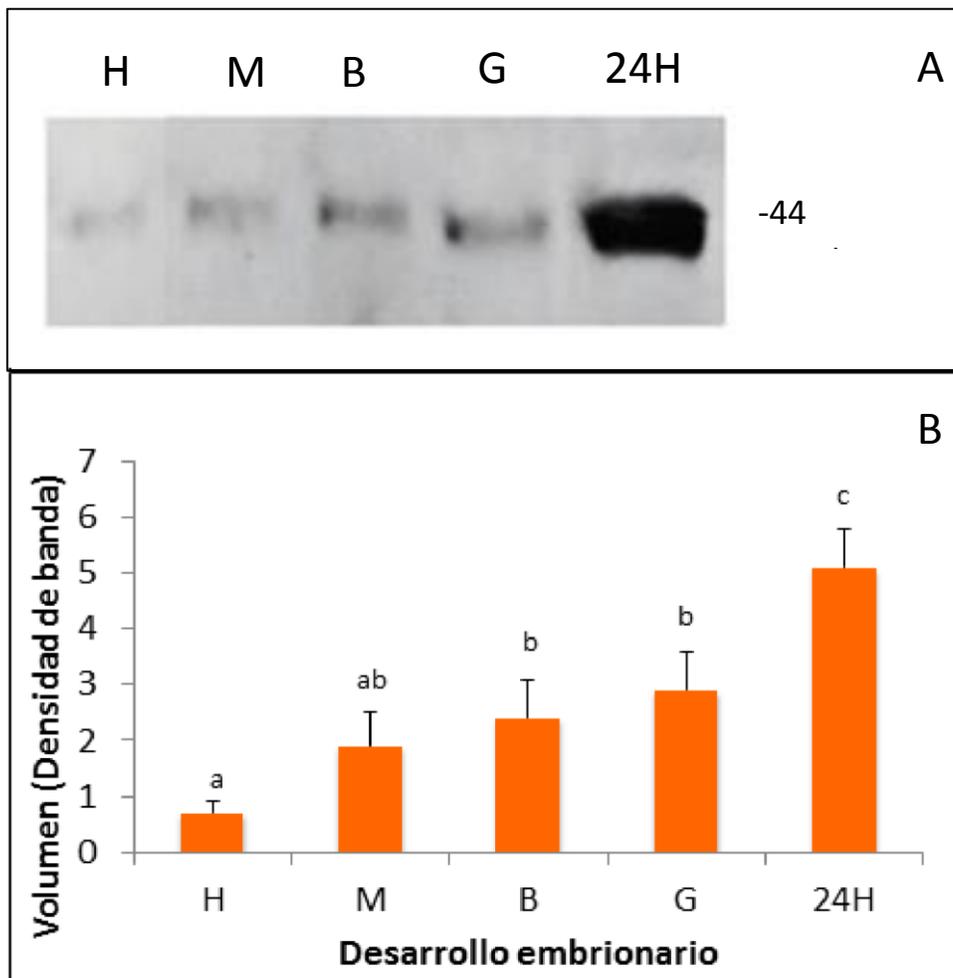


Figura 4: Análisis por *Western blot* de la proteína Fas-L durante el desarrollo embrionario de *S. lalandi*, en muestras no flotantes. El anticuerpo Anti Fas-L (MAB1858) reconoció una banda reactiva de 44 kDa en todos los estadios del desarrollo (A), la cual aumentó en intensidad en la medida que avanzó el desarrollo embrionario (B). Las barras representan la media \pm la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

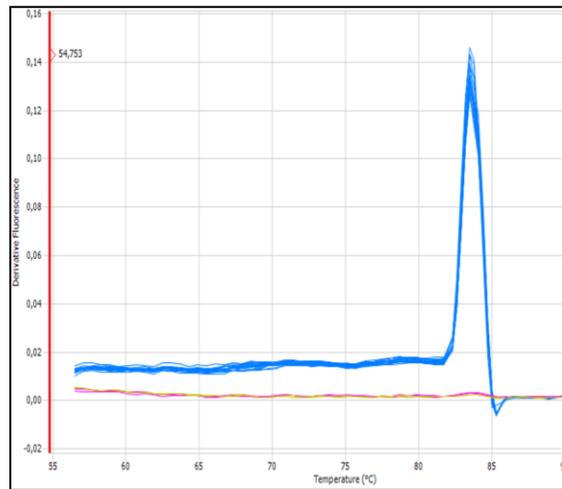


Figura 5: Curva de Melt obtenida en los experimentos de RT-qPCR para los partidores de Caspasa 8 utilizados en este trabajo. Se observa un claro peak de fluorescencia entre 80 y 85°C. Las líneas azules representan las muestras con partidor y las rojas los controles sin partidor y sin templado.

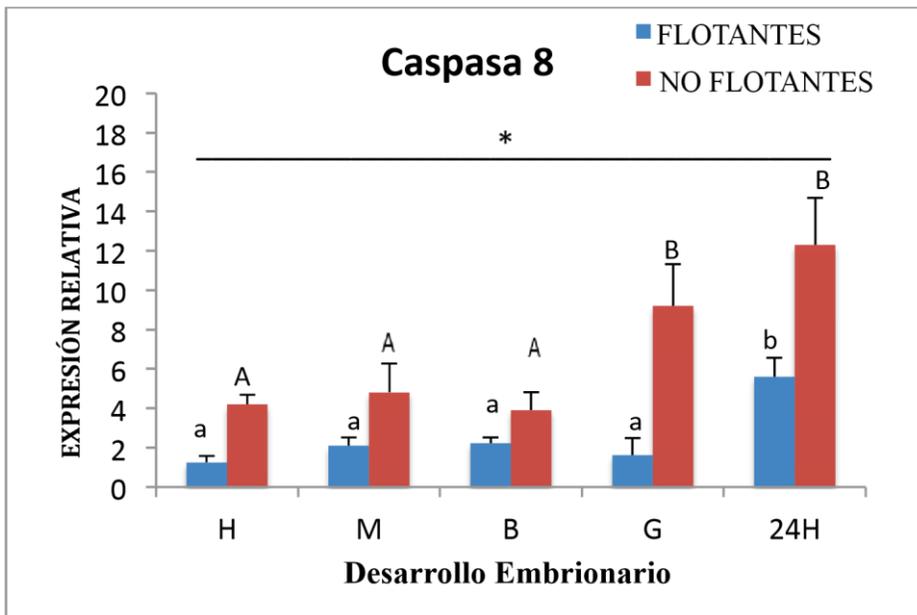


Figura 6: Expresión relativa de Caspasa 8 evaluada mediante RT-qPCR en el desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi* en muestras flotantes (barras azules) y no flotantes (barras rojas). Las barras representan la media \pm la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre embriones con el mismo nivel de flotabilidad y “*” indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras flotantes y no flotantes.

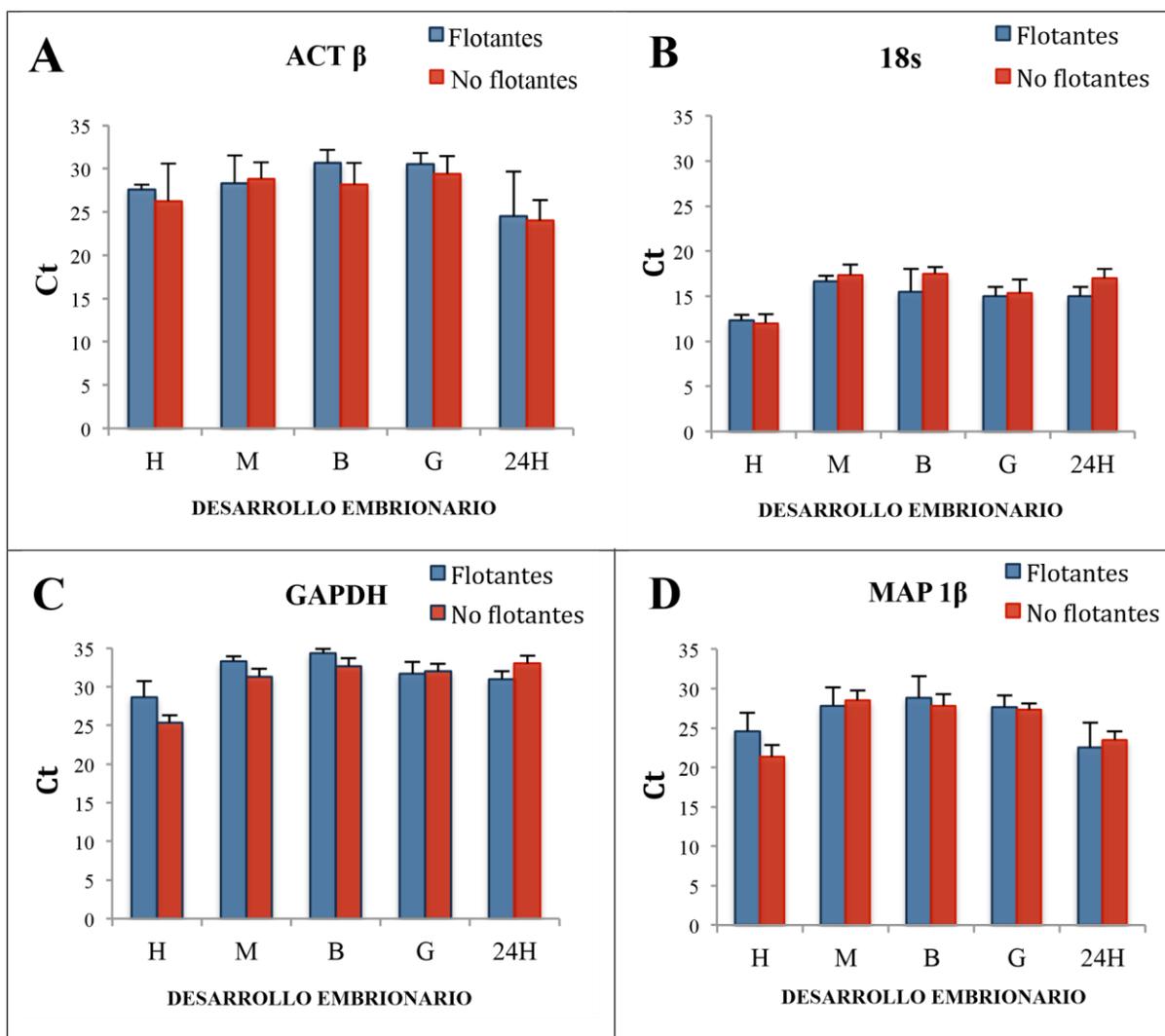


Figura 7. Análisis de expresión de los genes constitutivos ACTB (A), 18S (B), GAPDH (C) y MAP1 β (D), durante el desarrollo embrionario temprano de *S. lalandi* en muestras flotantes (barras azules) y muestras no flotantes (barras rojas). Las barras representan los valores promedio de Ct \pm la desviación estándar. No se encontraron diferencias significativas entre muestras flotantes y no flotantes en ningún estadio, en ninguno de los genes analizados ($p < 0,05$).