



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante

Dr. Rodolfo Amthauer M.

Instituto de Bioquímica y Microbiología

Facultad de Ciencias

**DESARROLLO DE UN MÉTODO INMUNOLÓGICO PARA
EVALUAR ETAPA DE VITELOGÉNESIS EN
*Dissostichus eleginoides***

Tesis de Grado presentada como parte de
los requisitos para optar al Título
Profesional de *Bioquímico*

FRANCISCA ANDREA CÁRDENAS VIDAL

VALDIVIA – CHILE

2014

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecer al Dr. Rodolfo Amthauer por permitirme formar parte de este trabajo y guiarme dentro de este proceso dándome los conocimientos y herramientas necesarias para llevar a cabo esta tesis, además de brindarme su apoyo, confianza, disposición y paciencia.

De igual forma agradecer a la Dra. Margarita Concha por sus consejos y apoyo en el desarrollo de este trabajo.

También agradecer al Dr. Luis Vargas por su gran disposición a ayudar en lo que fuera necesario tanto en el desarrollo de la tesis, como en mi formación.

Igualmente agradecer a Mauricio por su ayuda, disposición y apoyo a lo largo de todo el desarrollo de este trabajo.

Agradecer a mi familia por su gran apoyo durante todos estos años quienes han creído en mis decisiones y han puesto toda su disposición para cumplir mis metas.

Por otro lado también quiero agradecer a mis amigos que estuvieron presentes en este proceso y compañeros de laboratorio por su preocupación, ayudarme a seguir adelante y a sacarme de la rutina.

Finalmente agradecer al proyecto FONDEF DA09I1003 y al Sr. Alberto Reyes, director del proyecto (Corporación de Educación la Araucana), por su apoyo en la realización de esta tesis.

ÍNDICE GENERAL

	Página
I. RESUMEN	1
SUMMARY	2
II. INTRODUCCIÓN	3
III. MATERIALES Y MÉTODOS	10
1. Materiales	10
1.1 Reactivos	10
1.2 Equipos	11
1.3 Muestra	12
2. Métodos	12
2.1 Extracción de proteínas de ovas	12
2.2 Purificación de lipovitelina mediante cromatografía de filtración	13
2.3 Determinación del peso molecular de lipovitelina por HPLC	13
2.4 Determinación de concentración de proteínas de ovas	14
2.4.1 Densidad óptica	14
2.4.2 Método de Biuret	14
2.5 Análisis de proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE	15
2.6 Detección de fosfoproteínas	16
2.7 Preparación de antisuero contra lipovitelina (Vg)	16
2.7.1 Obtención del suero preinmune	17
2.7.2 Inmunización con lipovitelina en condiciones nativas (VgN)	17

	Página	
2.7.3	Immunización con la cadena pesada de lipovitulina en condiciones desnaturalantes (VgD)	18
2.8	Evaluación del título de los antisueros mediante <i>Dot Blot</i>	20
2.9	Evaluación de especificidad del antisuero mediante <i>Western Blot</i>	21
2.10	Inmunodetección de Vg en plasma de <i>D. eleginoides</i>	21
2.11	Montaje de ensayo de ELISA para Vg plasmática	22
IV.	RESULTADOS	23
1.	Análisis de proteínas plasmáticas de <i>D. eleginoides</i>	23
2.	Preparación y caracterización de proteínas de ovas de <i>D. eleginoides</i>	28
2.1	Purificación de lipovitulina	30
2.2	Análisis lipovitulina purificada	30
2.3	Peso molecular proteína purificada	32
3.	Evaluación Antisueros	34
3.1	Evaluación del título de antisueros	34
3.2	Evaluación de la especificidad del antisuero contra Vg	36
4.	Estandarización de métodos para detección de Vg en plasma de <i>D. eleginoides</i>	38
4.1	Montaje de ensayo <i>Dot Blot</i> para evaluar Vg en plasma de <i>D. eleginoides</i>	38
4.2	Montaje de ensayo ELISA indirecto para cuantificar Vg en plasma de <i>D. eleginoides</i>	40

	Página
V. DISCUSIÓN	45
VI. BIBLIOGRAFÍA	57

Índice de Figuras

	Página
Figura 1: Separación electroforética de extracto de ovas de <i>D. eleginoides</i> , utilizado para inmunización con proteína desnaturalada (VgD)	19
Figura 2: Análisis de muestras de plasma de <i>D. eleginoides</i>	24
Figura 3: Electroforesis en condiciones desnaturalantes de proteínas plasmáticas de <i>D. eleginoides</i> , tinción: azul de Coomasie y Morin	27
Figura 4: Análisis de extracto proteico de ovas y lipovitelina purificada	29
Figura 5: Cromatograma de extracto de proteínas de ovas de <i>D. eleginoides</i>	31
Figura 6: Curva de calibración para determinar el peso molecular de lipovitelina	33
Figura 7: Evaluación del título del antisuero utilizando <i>Dot Blot</i>	35
Figura 8: Evaluación especificidad del antisuero por <i>Western Blot</i>	37
Figura 9: Montaje del ensayo <i>Dot Blot</i> para detección de Vg en plasma	39
Figura 10: Curva de calibración ELISA indirecto para cuantificación de Vg	41
Figura 11: Concentración Vg en distintas muestras determinado por ELISA indirecto	43

Índice de Tablas

	Página
Tabla I: Presencia del doblete (Vg) en las distintas muestras de plasma analizadas	25
Tabla II: Tabla concentraciones Vg en muestras de plasma de <i>D. eleginoides</i>	44

ABREVIACIONES

BCIP	: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato
Blotto	: Solución de bloqueo
ELISA	: Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
FBPasa	: Fructosa-1,6-bisfosfatasa
FPLC	: Cromatografía líquida de mediana eficiencia (Fast Performance Liquid Chromatography)
GnRH	: Hormona liberadora de gonadotropina
GtH	: Hormona gonadotropina
HPLC	: Cromatografía líquida de alta eficiencia (High Performance Liquid Chromatography)
IgG	: Inmunoglobulina G
NBT	: Cloruro de nitroblue tetrazolium
OD	: Densidad óptica
p-NPP	: Para-nitrofenilfosfato
PAGE	: Electroforesis gel poliacrilamida
PBS	: Tampón fosfato salino
PSA	: Persulfato de amonio
SDS	: Dodecil sulfato de sodio
TBS	: Tris buffer salino
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
Tris	: Tris (hidroximetil) aminometano
Tween20	: Polisorbato 20 o Monooleato de Polioxietileno Sorbitan

- Vg** : Vitelogenina
- VgN** : Vitelogenina en condiciones nativas
- VgD** : Vitelogenina en condiciones desnaturalantes

I. RESUMEN

El bacalao de profundidad del Pacífico (*Dissostichus eleginoides*) es un pez cuyo cultivo comercial podría tener un gran potencial económico para nuestro país. Dado que estos peces comienzan a desovar a avanzada edad, existe gran interés en poder identificar a las hembras en etapa de producción de las ovas, conocida como vitelogénesis. La vitelogenina (Vg) es la proteína precursora de las principales proteínas de la yema de las ovas, y es sintetizada por el hígado bajo control hormonal. La aparición de Vg en el plasma es indicativo de que las hembras ovíparas se encuentran en etapa vitelogénica. Con el fin de identificar a las hembras que estén en ésta etapa, se desarrolló un método de detección inmunológico para evaluar Vg en plasma de *D. eleginoides*. Para la obtención del antisuero requerido, específico contra Vg, se realizaron las siguientes etapas: extracción de la fracción proteica de un pool de ovas de *D. eleginoides*; análisis electroforético y cromatográfico de las proteínas y purificación de lipovitelina. Sueros anti-Vg se prepararon inmunizando conejos con lipovitelina nativa o con la banda pesada de lipovitelina desde el gel de poliacrilamida. Al antisuero así generado se le determinó su título mediante *Dot Blot* y luego se evaluó su especificidad mediante *Western Blot*. El antisuero VgN resultó de un elevado título, y altamente específico, reconociendo el doblete de 180 kDa presente en muestras de ciertas hembras en algunas fechas, bandas ausentes en machos y otras hembras. Por último, se establecieron las condiciones adecuadas para la detección y cuantificación de Vg en el suero de *D. eleginoides* mediante *Dot Blot* y ELISA indirecto. Los resultados muestran que las hembras positivas coinciden, la mayoría de ellas, en concentraciones elevadas de Vg plasmática en el periodo entre junio y octubre.

SUMMARY

The aquaculture of the patagonian toothfish (*Dissostichus eleginoides*) could be of great economic potential for our country. As these fish begin to spawn at age of 8-10 years, there is great interest in identifying the females in the eggs maturation stages, known as vitellogenesis. Vitellogenin (Vg) is the precursor protein of the eggs main yolk proteins and is synthesized by the liver under hormonal control. The appearance of vitellogenin in plasma is indicative that oviparous females are in vitellogenic phase. To identify females in this stage an immunological detection method was developed to detect Vg in the plasma of *D. eleginoides*. To obtain the required antiserum, specific against Vg, the following steps were performed: isolation of a crude protein fraction from a pool of eggs of *D. eleginoides*; electrophoretic and chromatographic analysis of the proteins and purification of lipovitellin. Vg anti-sera were prepared by immunizing rabbits with native lipovitellin (VgN) or the heavy band of the lipovitellin from the polyacrylamide gel. The titration of the obtained antiserum was performed by *Dot Blot* and its specificity was assessed by *Western Blot*. The VgN antiserum resulted in a high titration and highly specific, recognizing the double band of around 180 kDa present in samples of certain females in some dates, and absent in males and other females. Finally, suitable conditions for the detection and quantification of Vg in serum of *D. eleginoides* by *Dot Blot* and indirect ELISA were established. The results show that most of the positive females have higher concentrations of plasmatic Vg in the period between June and October.

II. INTRODUCCIÓN

El cultivo de peces marinos ha suscitado gran interés en las últimas décadas, experimentando un importante auge en años recientes (FAO, 2012). En el caso de nuestro país, Chile es un país privilegiado desde el punto de vista pesquero y acuicultor debido a su gran longitud de cerca de 4.400 kilómetros en su territorio continental, además de sus 12 millas de mar territorial y 200 millas de zona económica exclusiva, lo cual le otorga una superficie de 3,4 millones de km² de mar (Ramírez, 2012). Gracias a su excepcional ubicación, nuestro país posee costas en las cuales se encuentran ecosistemas de gran productividad que le otorgan ventajas comparativas como productor de recursos pesqueros y de acuicultura, altamente valorados y demandados en los mercados internacionales. Chile ocupa el séptimo lugar en producción pesquera mundial con un 2,8% de la producción, avanzando tres lugares respecto a la producción del 2010 y sobrepasando a naciones como Japón, Rusia y Noruega. Considerando solo la producción acuícola, Chile se encuentra en el noveno lugar, con el 1,5% de producción en el mundo (Aqua, 2013). La gran relevancia que se le da a este tema se debe en parte al gran valor que tienen los productos derivados de especies marinas en el mercado internacional. El interés por consumir estos productos es debido a que son un maravilloso sustituto de la proteína de la carne, siendo un alimento altamente nutritivo (FAO, 2012). Este tipo de carne se caracteriza además de su delicado sabor, por poder ser consumido de diversas formas lo que contribuye a explicar su alta demanda. Adicionalmente es importante destacar que el consumo de pescado es altamente recomendado por su bajo contenido en colesterol y altos niveles de ácidos grasos insaturados de la serie omega 3 y 6 (Kris-Etherton *et al.*, 2002).

Sin lugar a dudas en la actualidad las especies cultivadas de mayor importancia económica para el país corresponden a los salmonideos. Sin embargo, las especies endémicas de las costas Chilenas también han ido ganando atractivo comercial, pero dependen de los volúmenes que se puedan capturar. Dentro de estas especies se encuentra el bacalao de profundidad (*Dissostichus eleginoides*), el cual ha tenido un gran auge en la industria pesquera por tener un gran potencial económico y altas expectativas hacia el futuro. La comercialización de *D. eleginoides*, se comenzó desde los años 70, debido a la gran demanda y al elevado precio que logra su carne en los mercados, llegando a tener un valor de \$25 US/kg durante los últimos años. Según registros de Sernapesca, el desembarque total de bacalao en Chile se ha mantenido durante los últimos años en un promedio de 5.600 toneladas, teniendo como mercado principal Estados Unidos y Japón (Silva, 2010).

El bacalao de profundidad también conocido como merluza negra o bacalao austral, se caracteriza por ser un pez de aguas profundas que habita en las aguas frías del océano en el área subantártica, distribuyéndose hasta los 2.500 metros de profundidad, esto tiende a variar geográficamente, lo cual puede estar relacionado con la temperatura del agua (Collins *et al.*, 2010). Uno de los lugares donde se pueden encontrar estos ejemplares es en las costas de Chile y es precisamente en nuestro país donde han comenzado los primeros esfuerzos a nivel mundial por lograr cultivar esta especie. Una de las razones por la cual se le está dando tanto énfasis al cultivo de esta especie es debido a la reducción de su población en el último tiempo. Desde la década de 1990, la pesca ilegal, la cual no es fácilmente regulable, ha reducido el tamaño de la población de bacalao de profundidad considerablemente (Lack, 2008). Además de esto, la

reducción de número de ejemplares también se debe a sus depredadores naturales, como lo es el caso del cachalote (Moreno *et al.*, 2003).

D. eleginoides es una especie longeva que llega a vivir 50 años (Reyes *et al.*, 2012), se caracteriza por poseer bajas tasas de fecundidad y baja mortalidad natural (Cubillos y Araya, 2007). Esta especie se considera un carnívoro de especies mixtas alimentándose principalmente de peces y en segundo lugar de crustáceos y cefalópodos; esto dependiendo de la zona en que habite este pez; es por ello que *D. eleginoides* es considerado como un alimentador oportunista (García de la Rosa *et al.*, 1997). El bacalao de profundidad ha sido registrado con tamaños hasta 2,15 metros pudiendo pesar hasta 95 kg (Kock, 1985). Esta es una especie de lento crecimiento y su madurez sexual ocurre alrededor de los 10 años de edad, por lo que su reproducción no es un tema sencillo, más si se considera la demanda de la pesquería nacional e internacional y los depredadores. Los machos alcanzan la madurez sexual 1 a 3 años antes que las hembras y ocurre cuando éstos miden entre 72 y 90 cm, lo que equivale a una edad de entre 7 a 11 años. Las hembras, en cambio, alcanzan la madurez sexual entre 90 y 110 cm que equivale una edad entre 9 a 12 años (Collins *et al.*, 2010).

El bacalao de profundidad desova en la parte sur del país, su ciclo reproductivo se caracteriza por el desove en la época de invierno, principalmente entre Julio y Agosto. Es justamente en ésta época en que las hembras maduran y emergen a profundidades que no superan los 500 metros (Arana, 2009).

Se sugiere también que hay un segundo periodo menos intenso del desove que se produce entre Abril y Mayo. Esta especie presenta una fecundidad que oscila entre 11 a

23 huevos por gramos de peso corporal. Estos ovocitos en estadios muy avanzados alcanzan a medir entre 4,3 a 4,4 mm de diámetro (Young *et al.*, 1999).

Poder determinar la madurez sexual y el periodo de ovoposición de estos peces es de vital importancia para su cultivo, para lo cual un buen indicador de ésta es el proceso de vitelogénesis (proceso de formación del vitelo), cuyo inicio está bajo el control de estrógenos (Heppell *et al.*, 1995). Este control hormonal es inducido por los factores medio ambientales, lo que finalmente llevará a la inducción inicial del desarrollo gonadal (Redding y Patiño; 1993). Los fotoreceptores de la retina o los quimiorreceptores del epitelio olfatorio son los encargados de captar y convertir los estímulos ambientales en señales electroquímicas que se dirigen vía neuronas sensoriales al hipotálamo, donde son procesadas induciendo a la secreción de hormonas peptídicas como GnRH (hormona liberadora de gonadotropina). Estas hormonas se dirigen a la glándula pituitaria donde inducen y regulan la producción de hormona GtH (hormona gonadotropina), que luego es liberada al torrente sanguíneo por donde circula hasta llegar al ovario, donde la capa folicular bajo la influencia de la GtH produce 17β -estradiol, que es el que directamente controla el desarrollo gonadal (Patiño, 1997; Redding y Patiño, 1993). El proceso hormonal que ocurre durante la vitelogénesis es el siguiente: en la capa folicular bajo la influencia de la GtH, se produce 17β -estradiol, el cual es liberado al sistema circulatorio y al llegar al hígado estimula la síntesis y secreción de Vg al torrente sanguíneo, proteína precursora de la yema de huevo (Banaszak *et al.*, 1991). Posterior a la síntesis y secreción de Vg al torrente sanguíneo, ésta es transportada hacia el ovario, atraviesa el folículo ovárico y se adhiere a receptores específicos ubicados en la superficie del ovocito siendo incorporado al

citoplasma mediante endocitosis. Una vez dentro del ovocito la Vg sufre proteólisis dando origen a las proteínas lipovitelina y fosvitina que son los principales componentes del vitelo y representan las proteínas mayoritarias de ovas de peces. Se conoce que las proteínas de la yema contribuyen a más de un 80 a 90% del peso seco de los huevos en teleósteos (Selman y Wallace, 1989).

La vitelogenina según Stifani *et.al.* (1990), es una proteína específica de las hembras de vertebrados ovíparos (anfibios, aves, peces y reptiles), la cual se expresa durante el ciclo de maduración ovípara. La Vg de teleósteos y anfibios es una glicolipofosfoproteína de elevado peso molecular (250 - 600 kDa) que es sintetizada en el hígado en respuesta a 17β -estradiol (Norberg y Haux, 1985). Tras ser procesada en el ovocito por la acción de diversas proteasas, entre las cuales se encuentra la catepsina D, la Vg da lugar a las proteínas del vitelo que son almacenadas en el ovocito como fuente energética y nutritiva para el posterior desarrollo embrionario (Tyler *et al.*, 2000). Este proceso, conocido como vitelogénesis, es el principal causante del crecimiento del ovocito. La presencia de Vg en el plasma es coincidente con la aparición de los primeros gránulos de vitelo en los ovocitos (Stifani *et al.*, 1990). Por otro lado se conoce que esta proteína se encuentra conjugada con lípidos, carbohidratos y fosfatos; tiene la capacidad de unir cationes divalentes, principalmente calcio (Guzmán, 2003).

Diferentes técnicas se han establecido para determinar los niveles de Vg en sangre, entre ellos inmunoaglutinación (Le Bail y Breton, 1981), la densitometría después de la electroforesis (Van Bohemen y Lambert, 1981), inmunodifusión radial y radioinmunoensayo (Idler y Campbell, 1980). La Vg también puede ser determinada

indirectamente midiendo los niveles de calcio o fosforo de la fosfoproteína (Whitehead *et al.*, 1978). Cada una de estas técnicas tiene ventajas y desventajas distintas, dependiendo del uso al que se destine. Este tipo de técnicas podrían ser útiles para la determinación de los niveles sanguíneos de Vg durante la maduración sexual. En peces se cuantificó Vg por primera vez por ELISA en *Solea vulgaris* (Nuñez Rodriguez *et al.*, 1989), a partir de esto se llevó a cabo en distintas familias de peces. En otras especies se ha cuantificado Vg en plasma para seguir el proceso de vitelogénesis y maduración de las ovas como en Tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Ndiaye *et al.*, 2006), pez cebra (*Danio rerio*) (Brion *et al.*, 2002), carpa (*Cyprinus carpio*), perca (*Perca fluviatilis*) (Hennies *et al.*, 2002) y morraja azul (*Lepomis macrochirus*) (Cheek *et al.*, 2004) entre otros. Por otro lado es importante cuantificar Vg en plasma, debido a que la síntesis de Vg es dependiente de estrógeno, por lo tanto, la inducción de Vg en peces machos o hembras inmaduras puede servir como un biomarcador relativo para la exposición de estrógenos en vertebrados ovíparos (Sumpler y Jobling, 1995).

La determinación de Vg en sangre puede ser un problema cuando se quiere determinar en terreno, debido a que muchas de las técnicas anteriormente mencionadas requieren de personal capacitado junto con muchos recursos en cuanto a materiales e implementos.

Es por ello que este trabajo tiene la finalidad de desarrollar un método de detección inmunológico para evaluar Vg en plasma de *D. eleginoides*, el cual sea de un fácil uso e interpretación para el personal que trabaja en terreno. Esto permitirá contar con un ensayo rápido y directo para poder identificar de manera confiable la madurez sexual y también el periodo de ovogénesis de dicha especie.

Para realizar este método de detección inmunológico se postula como hipótesis:

“La proteína lipovitelina de ovas de *Dissostichus eleginoides* es un buen antígeno para desarrollar un antisuero específico que permita evaluar cuantitativamente vitelogenina en plasma.

Para lograr esto se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo general:

- Desarrollar un antisuero que permita la evaluación de Vg en plasma de *D. eleginoides*.

Objetivos específicos

- Analizar la composición proteica de las ovas de *D.eleginoides*.
- Purificar lipovitelina del extracto de ovas mediante separación electroforética y/o cromatográfica.
- Generar un antisuero anti-lipovitelina capaz de detectar a la Vg en el plasma
- Evaluar el título y especificidad del antisuero obtenido.
- Desarrollar un método inmunológico aplicable en terreno para la detección de Vg en plasma de hembras de bacalao de profundidad.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1. Reactivos

Arquimed: Xilol

BioLabs: estándar de peso molecular para geles de poliacrilamida (Prestained Protein Marker, BroadRange)

Calbiochem: p-Nitrofenil Fosfato (p-NPP)

Calo: leche descremada

General Electric: Superdex S200,

Invitrogen: estándar de peso molecular para geles de poliacrilamida (Mark12™ Unstained Standard)

Jackson ImmunoResearch Laboratories: Anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina

MaestroGen: estándar de peso molecular para geles de poliacrilamida (AccuRuler RGB Prestained Protein Ladder)

Merck: acrilamida, glicerol 87%, β -mercaptoetanol, azul de bromofenol, fosfato de sodio, cloruro de magnesio, sulfato cúprico pentahidratado, citrato sódico, carbonato de sodio, bicarbonato de sodio

Promega: bisacrilamida, NBT, BCIP, Tween20

Sigma: coadyuvante completo de Freund, coadyuvante incompleto de Freund, Morin Hidrato.

TCL, tecnología y ciencia: isopropanol, ácido acético 90%, metanol (todos de grado técnico)

Thermo: estándar de peso molecular para geles de poliacrilamida (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder)

Whatman: membrana de nitrocelulosa

Winkler: tampón fosfato salino (PBS), Tris(hidroximetil)aminometano(Tris), persulfato de amonio (PSA), N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED), dodecilsulfato de sodio (SDS), glicina, Albúmina de suero bobino (BSA), azul de Coomassie, Cloruro de sodio.

1.2. Equipos

- Balanza de precisión TE4101 Sartorius
- Balanza analítica GR-200 AND
- ULTRA-TURRAX® T10 basic
- Centrifuga refrigerada SIGMA 2-16PK
- Centrifuga SIGMA 1-14
- Fuente de poder PowerPac™ Basic Power Supply Bio-Rad
- Espectrofotómetro UV-visible Evolution 60 ThermoScientific
- Agitador orbital Heidolph Polymax 1040
- Thermo-Shaker-MS-100
- BioPette™ Autoclavable Labnet
- Lector Multi-Modal de Microplacas Synergy 2BioTek
- Documentador de geles G:BOX Syngene
- Placas Elisa 96 pocillos Fisherbrand
- Columna XK 16, 140 ml, diámetro 1,6 cm, General Electric

- Cromatógrafo FPLC AKTA purifier con detector UV y colector de fracciones con bomba cuaternaria, y FPLC AKTA prime con filtro UV de 280 nm y colector de fracciones, General Electric

1.3. Muestra

Para llevar a cabo este trabajo se utilizaron muestras de ovas y plasma de *D. eleginoides*, las que fueron aportadas por la dirección del proyecto Fondef D06I1077. Las muestras de plasma de bacalao fueron obtenidas de peces identificados por medio de microchips en muestreos en distintas fechas. Las muestras de plasma se mantuvieron a -20 °C hasta su uso.

2. Métodos

2.1. Extracción de proteínas de ovas

Se utilizaron 11 gramos de ovas de *D.eleginoides* las cuales se homogeneizaron en 20 ml de tampón PBS 1X pH 7,5 (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM / Na₂HPO₄ 8,1 mM/ KH₂PO₄ 1,5 mM) utilizando un homogeneizador ULTRA-TURRAX. El homogeneizado obtenido se centrifugó en una centrifuga SIGMA 2-16pK a 9000 x *g* durante 10 minutos a 5 °C y se reservó el sobrenadante. Este extracto de proteínas totales de ovas obtenido se mantuvo a -20 °C hasta su uso.

2.2. Purificación de lipovitelina mediante cromatografía de filtración

Para la purificación de lipovitelina, se utilizó una columna de exclusión molecular (Superdex S200 1,6 cm x 70 cm, volumen de columna: 140 ml) la cual fue acoplada a un cromatógrafo FPLC AKTA Purifier (General Electric). La columna fue equilibrada con PBS 1X pH 7,5, para luego cargar 12,6 mg del extracto de proteínas de ovas utilizando un “loop” de 1 ml. El instrumento permitió monitorear la absorbancia a 280 nm manteniendo un flujo constante de 1 ml/min. Las fracciones obtenidas en la etapa de elución correspondientes a la proteína mayoritaria de las ovas, fueron mantenidas a -20 °C hasta su uso.

2.3. Determinación del peso molecular de lipovitelina por HPLC

Para ello se realizó una cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna de Silica BioBasic 300 de 5 µm (250 x 4,6 mm volumen columna: 4,15 ml). Esta columna fue equilibrada con buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 7,0. Para la confección de la curva de calibración se utilizaron 7 proteínas purificadas (1 mg/ml) en condiciones nativas de pesos moleculares conocidos; Citocromo (14 kDa), Ovoalbumina (44 kDa), Albúmina (66 kDa), Aldolasa (158 kDa), Catalasa (250 kDa), Ferritina (440 kDa) y Tiroglobulina (669 kDa). Posteriormente se cargó en el equipo la muestra de lipovitelina purificada (0,7 mg/ml) y se calculó su peso molecular interpolando en la curva de calibración. Para ello fue necesario calcular el coeficiente de distribución utilizando la siguiente formula: $K_D = \frac{V_R - V_o}{V_m - V_o}$ donde V_R corresponde al volumen de elución de cada analito, V_o corresponde al volumen de vacío de la columna (3,443 min) y V_m corresponde al volumen total de la columna (6,86 min). A partir de esto se graficó el K_D

de los estándares vs el log PM y en él se interpola el Kd de la muestra. Con fines prácticos las unidades fueron expresadas en función del tiempo en minutos.

2.4. Determinación de concentración de proteínas de ovas

2.4.1. Densidad óptica

La concentración de proteínas en el sobrenadante se estimó por su lectura en espectrofotómetro a 280 nm, asumiendo $1\text{OD} = 1\text{ mg/ml}$.

2.4.2. Método de Biuret

Para la determinación de la concentración de proteínas en el sobrenadante también se utilizó el método de Biuret (Reigler, 1914). Para ésta determinación se utilizaron 250 μl de muestra diluida en 250 μl de agua destilada a esto se le agregó 2 ml del reactivo de Biuret. El equipo se llevó a cero utilizando como blanco 2 ml de reactivo con 500 μl de agua destilada, lo que se midió a 540 nm al igual que la curva y la muestra. La concentración de proteínas de la muestra se obtuvo por interpolación del valor de la absorbancia en una curva de calibración.

2.5. Análisis de proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE

El extracto de proteínas obtenido de las ovas y fracciones cromatográficas obtenidas de la purificación de lipovitelina, se analizaron por electroforesis en SDS-PAGE según lo descrito por Laemmli (1970). La composición del gel separador utilizado fue 7,5 o 12% (p/v) de poliacrilamida, tampón Tris-HCl 0,375 M (pH 8,8), SDS 0,1% [p/v]; persulfato de amonio 0,03% [p/v] y TEMED 0,1% [v/v]. Una vez polimerizado el gel separador, se preparó un gel espaciador sobre éste con la siguiente composición: poliacrilamida 4% [p/v], tampón Tris-HCl 0,125 M pH 6,8, SDS 0,1% [p/v]; persulfato de amonio 0,03% [p/v] y TEMED 0,5% [v/v]. Una alícuota del extracto de proteínas totales de ovas se solubilizó en tampón de muestra compuesto por: Tris- HCl 62,5 mM pH 6,8; SDS 1% [p/v]; glicerol 10% [v/v], β -mercaptoetanol 5% [v/v] y azul de bromofenol 0,05% [p/v] (como marcador del frente iónico). Para facilitar la desnaturalación, las muestras se incubaron a 90°C por 10 min antes de ser cargadas al gel. La electroforesis se realizó aplicando una corriente constante de 25 mA hasta que el frente iónico alcanzó el final del gel. El buffer de corrida contenía Tris-HCl 25 mM; glicina 0,19 M y SDS 0,1% [p/v]. Una vez finalizada la electroforesis, se fijó el gel en una solución de isopropanol 25% [v/v] y ácido acético 10% [v/v], durante 2 horas con agitación orbital y posteriormente se tiñó con una solución de azul de Coomassie R-250 0,3% [p/v], metanol 30% [v/v] y ácido acético 10% [v/v] durante 2 horas. Para desteñir el gel se utilizó una solución de desteñido compuesta por metanol 25% [v/v] y ácido acético 10% [v/v], el gel se mantuvo en agitación con esta solución hasta la aparición de las bandas.

2.6. Detección de fosfoproteínas

Para detectar las proteínas fosforiladas presentes en las muestras de plasma fraccionadas por SDS-PAGE se llevó a cabo una tinción fluorescente con 3,5,7,20,40-pentahidroxi flavona (Morin) (Wang *et al.*, 2013). Una vez finalizada la electroforesis el gel se sumergió en 100 ml de etanol 50% y ácido acético 2% con agitación durante 15 minutos. Posteriormente se incubó con una solución de nitrato de aluminio 150 μ M por 15 minutos y luego se lavó con metanol 20% durante 15 minutos. Después de este procedimiento, el gel se incubó por 30 minutos en 50 ml de solución de tinte con Morin hidrato 8 μ M y posteriormente se sumergió en 50 ml de acetato de sodio 50 mM y metanol 30% durante 15 minutos. Finalmente la imagen fluorescente del gel se digitalizó en un documentador de imágenes G:BOX utilizando un transiluminador UV.

2.7. Preparación de antisuero contra lipovitelina (Vg)

Para la preparación de los antisueros se utilizaron dos conejos machos Neozelandeses, de aproximadamente 8 meses. Estos se mantuvieron en cautiverio con dieta de concentrado y agua a libre disposición. La inmunización por vía subcutánea, se realizó en un conejo utilizando como antígeno la proteína mayoritaria de las ovas obtenido por SDS-PAGE (antígeno desnaturalado o VgD) y en el otro con la obtenida por cromatografía de filtración (antígeno nativo o VgN).

2.7.1. Obtención del suero preinmune

Días antes de la inmunización de los conejos, éstos fueron intervenidos para tomarles una muestra de sangre desde la vena marginal de la oreja de cada ejemplar con la ayuda de Xilol. La sangre obtenida se incubó por aproximadamente 1 hora a 37°C hasta retracción del coágulo, el suero obtenido se centrifugó a 2.000 rpm por 10 min a 4°C en una centrifuga refrigerada SIGMA 2-16PK utilizando un rotor 12072. El sobrenadante obtenido se incubó a 56°C durante 30 minutos en un thermo-shaker y posteriormente la muestra se centrifugó 20 min a 6.000 rpm. Finalmente, el sobrenadante se alicuotó y se guardó a -20°C.

2.7.2. Inmunización con lipovitelina en condiciones nativas (VgN)

La proteína en condiciones nativas se obtuvo por cromatografía de filtración, como se describe en 2.2. Para la primera inmunización se agregaron 3 ml de la lipovitelina purificada (2mg) a una jeringa de 10 ml a lo cual se le añadió 3 ml de coadyuvante de Freund completo. Esta mezcla fue emulsionada con la ayuda de un Ultra-Turrax antes de inyectar subcutáneamente en 6 puntos distintos en el lomo del conejo. La segunda inmunización se llevó a cabo 10 días después repitiendo el mismo procedimiento pero esta vez con coadyuvante de Freund incompleto, y 10 días después se volvió a inmunizar al conejo inyectando solamente 3 ml de fracción obtenida por cromatografía (Báez, 2004).

2.7.3. Inmunización con la cadena pesada de la lipovitelina en condiciones desnaturalantes (VgD)

La figura 1A muestra el análisis electroforético del extracto crudo de proteínas de ovas de *D. eleginoides*. La parte superior de los carriles indican la cantidad de muestra cargada, además se identifica el tamaño de las bandas más abundantes, correspondientes a subunidades de lipovitelina. Para contar con la cantidad suficiente de la banda de 90 kDa para la inmunización del conejo, se realizó un gel cargando todos los surcos con 50 µg de extracto de proteínas totales de ovas. El gel desteñado, luego de fotografiarlo se lavó por 1 hora con Tris-HCl 100 mM pH 7,5 y luego 2 horas en PBS 1X. Una vez lavado el gel, las 9 bandas correspondientes a la cadena pesada de la lipovitelina fueron cortadas con bisturí, tal como se muestra en la figura 1B. Las bandas cortadas fueron introducidas en una jeringa de 10 ml donde fueron homogeneizados con 2,5 ml de PBS 1X utilizando ULTRA-TURRAX. Para la primera inmunización se utilizó coadyuvante de Freund completo, del cual se le agregaron 3 ml a la jeringa con el homogeneizado. Para la segunda inmunización se repitió el mismo procedimiento a los 10 días pero esta vez utilizando coadyuvante de Freund incompleto, y 10 días después se realizó la última inmunización inyectando solamente el antígeno (Báez, 2004).

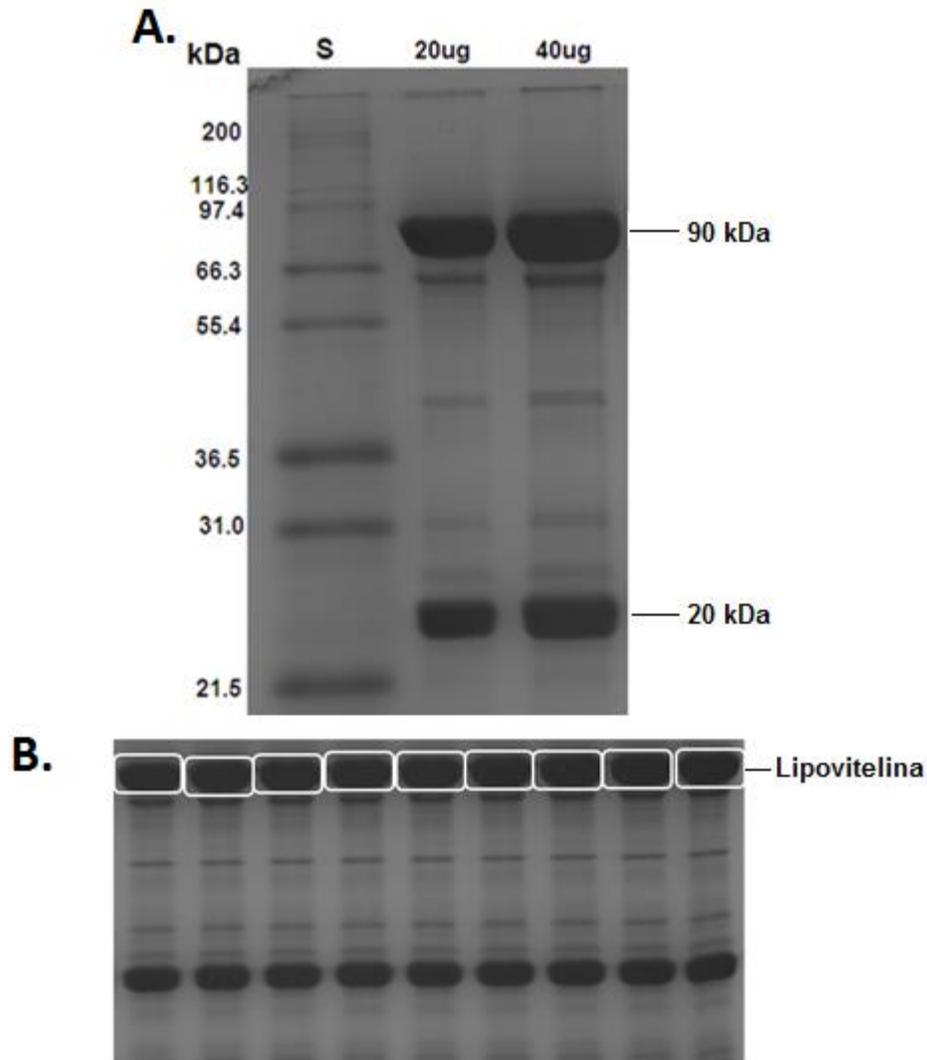


Figura 1: Separación electroforética de extracto de ovas de *D. eleginoides*, utilizado para inmunización con proteína desnaturalada (VgD). La figura muestra un gel SDS-PAGE al 12%. **A.-** Ambos carriles fueron cargados con extracto de proteínas obtenido de ovas de bacalao de profundidad. El primer carril fue cargado con 20µg de muestra, en tanto el siguiente fue cargado con 40µg. **B.-** Gel utilizado para inmunización de conejos con proteína desnaturalada (VgD) cargado en todos sus carriles con 50 µg de extracto de proteínas totales de ovas. Los cuadros blancos indican los cortes de las bandas realizados para posteriormente inmunizar al conejo.

2.8. Evaluación del título de los antisueros mediante *Dot Blot*

El título de los antisueros se determinó mediante la técnica de *Dot Blot* (Bolte *et al.*, 1997). Para la inmunodetección, se utilizaron membranas de nitrocelulosa las cuales se cargaron con 100 ng y 1 µg de extracto de proteínas totales de ovas. Las membranas fueron bloqueadas con solución “Blotto” 5% (leche descremada 5% [p/v], PBS 1X, Tween20 0,05% [v/v]) por 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante. Posterior al bloqueo se incubó durante 1 hora con el anticuerpo primario (se utilizó directamente el antisuero) en diluciones crecientes en solución “Blotto”. Las membranas fueron lavadas 3 veces durante diez minutos cada una con “Blotto”. A continuación se incubó durante una hora con anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (dilución 1/5.000), posteriormente se lavó las membranas utilizando TBS 1X tres veces durante 10 minutos cada vez. Finalmente se lavó 3 veces durante 10 minutos con TBS 1X y una vez durante 10 minutos con buffer fosfatasa alcalina (Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM). Para el revelado se utilizaron 33 µl de NBT (50 mg/ml) y 16,5 µl de BCIP (50 mg/ml) los cuales fueron mezclados con 5 ml de buffer fosfatasa alcalina, ésta solución fue agregada sobre las membranas y fueron agitadas unos minutos hasta observar la reacción.

2.9. Evaluación de especificidad del antisuero mediante *Western Blot*

La especificidad del antisuero contra Vg de bacalao se evaluó mediante la técnica de *Western Blot* (Burnette, 1981), utilizando muestras de suero de hembras y machos de bacalao. Esta técnica se llevó a cabo realizando previamente un gel de electroforesis descrito en el punto 2.5. Posteriormente se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa por electrotransferencia utilizando una fuente de poder la cual se programó a 130 mA durante 90 minutos. La membrana con las proteínas transferidas fueron tratadas de igual forma a lo descrito en el punto 2.8 utilizando tanto el anticuerpo primario como secundario en una dilución de 1:20.000.

2.10. Inmunodetección de Vg en plasma de *D. eleginoides*

La inmunodetección de Vg se realizó utilizando el ensayo en gota *Dot Blot* descrito en 2.8. Las muestras de plasma de bacalao de profundidad fueron diluidas 1:500 con TBS 1X. A partir de ésta dilución se tomaron 2 μ l de cada muestra, los cuales fueron inmovilizados sobre membranas de nitrocelulosa procediéndose a bloquear y lavar como en 2.8. En este caso se utilizó el antisuero anti-Vg preparado contra lipovitelina en condiciones nativa (VgN) en una dilución de 1:20.000. La incubación con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina se realizó utilizando una dilución de 1:20.000 en "Blotto" 5% durante una hora a temperatura ambiente con agitación. Finalmente su revelado se realizó como se indica en 2.8.

2.11. Montaje de ensayo de ELISA para Vg plasmática

Para llevar a cabo este montaje se prepararon diluciones de 1:500 de las muestras de plasma de bacalao de profundidad con TBS 1X. A partir de estas diluciones se utilizaron 100 µl de muestra por pocillo, los cuales se dejaron durante toda la noche a 4°C. Las placas posteriormente fueron lavadas 3 veces en forma rápida y 3 veces durante 10 minutos con 200 µl de solución de lavado (TBS 1X y Tween20 al 0,05%). A continuación se realizó la etapa de bloqueo la cual consistió en incubar con 200 µl de “Blotto” 2% (leche descremada 2% [p/v], PBS, Tween20 0,05% [v/v]) durante una hora, seguido a esto se llevó a cabo 6 lavados rápidos. Luego se incubó con 200 µl del antisuero VgN en dilución 1:20.000 en “Blotto 2%” durante 2 horas a temperatura ambiente y agitación. A continuación se realizó el mismo proceso de lavado mencionado anteriormente, para luego incubar con 200 µl de anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina diluido con “Blotto 2%” 1:20.000 durante 90 minutos a temperatura ambiente con agitación. Posteriormente se realizó el paso de lavado descrito previamente más dos lavados de 10 minutos con 200 µl tampón fosfatasa alcalina (Tris/HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM). Para el revelado se preparó una dilución de 1 mg/ml de p-NPP en tampón fosfatasa alcalina, dilución de la cual se tomaron 200 µl para cada pocillo y se dejó reaccionar durante 30 minutos a 25°C con agitación. Transcurrido el tiempo de reacción la micro placa se leyó a 405 nm en un lector Multi-Modal de Microplacas Biotek modelo Synergy 2. La curva de calibración se llevó a cabo con lipovitulina purificada en diferentes concentraciones.

IV. RESULTADOS

1. Análisis de proteínas plasmáticas de *D. eleginoides*

Para observar el patrón de proteínas plasmáticas de bacalao de profundidad se llevó cabo un análisis electroforético de éstas. Con el objetivo de facilitar el seguimiento, cada ejemplar mantenido en cautiverio fue identificado con un microchip, cuyo código también se asignó a cada muestra de plasma. El análisis de las proteínas plasmáticas se realizó utilizando un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 7,5% cargando en cada carril aproximadamente 18 µg de proteínas. En la Figura 2 se muestra a modo de ejemplo la imagen de uno de los geles realizado para un total de 111 muestras analizadas de plasmas (69 muestras de hembra y 42 muestras de macho). Como se puede observar todas las muestras exhiben una gran cantidad de bandas las que dan cuenta de la gran diversidad de proteínas presentes en el plasma. Sin embargo llama la atención la presencia de un doblete de aproximadamente 180 kDa, el cual se observa únicamente en algunos ejemplares hembras. Además este doblete está presente sólo en algunas épocas del año. Este hecho nos indicaría que dicha banda posiblemente se trate de Vg. A partir del análisis por electroforesis realizado a todas las muestras de plasma disponibles de los distintos ejemplares y de distintas fechas de muestreo se realizó una tabla resumen en la cual se especifica las hembras que presentan dicho doblete en las fechas correspondientes (Tabla I).

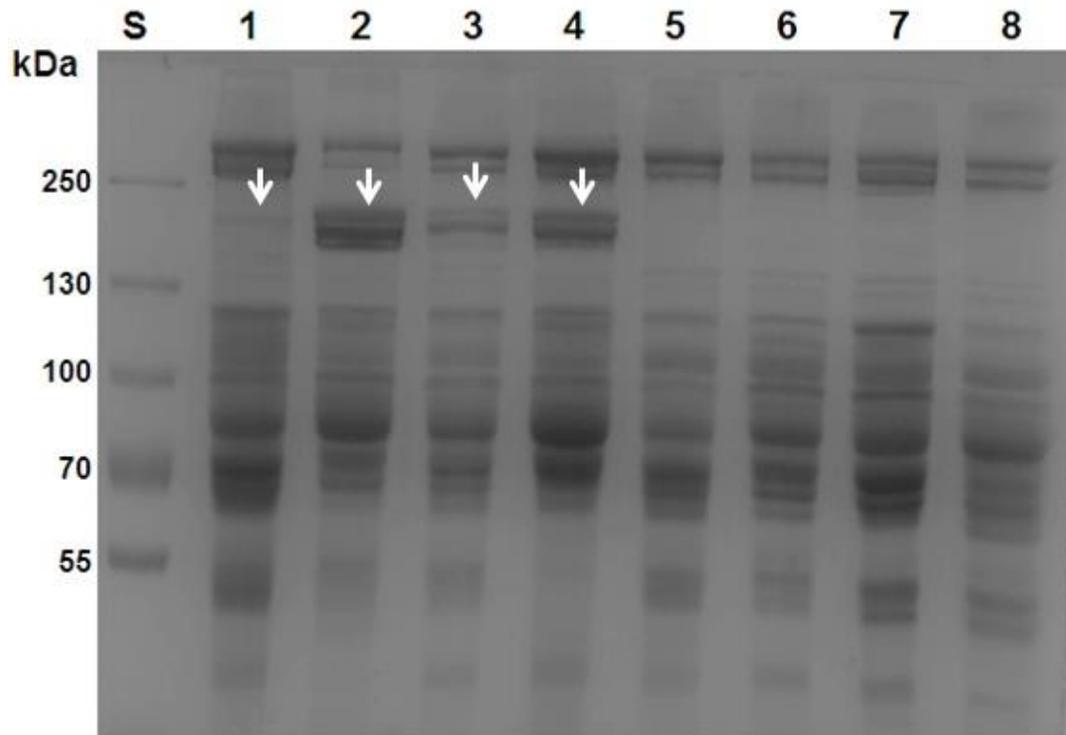


Figura 2: Análisis de muestras de plasma de *D. eleginoides*. Electroforesis SDS-PAGE al 7,5% de muestras de plasma de bacalao de profundidad, cada carril fue cargado con aproximadamente 18 μ g de proteína de muestra de plasma. Carriles del 1 al 6 son muestras de plasma de distintas hembras (del 1 al 6: DA40, 4E1B, CO1C, 7103, EDF5, F103). Carriles 7 y 8 son muestras de plasma de machos distintos (66BE y 8283). Las puntas de flechas blancas señalan al doblete característico presente solo en las 4 primeras hembras y ausente en machos el cual correspondería a Vg (180 kDa). Como estándar se utilizó PageRuler Plus Prestained Protein Ladder Thermo.

Tabla I: Presencia del doblete (Vg) en las distintas muestras de plasma analizadas.

Ejemplar	Sexo	22.06.11	22.09.11	07.12.11	29.03.12	28.06.12	04.10.12	28.01.13
7103	H	o	o	o	s/m	+	+	o
CO1C	H	o	o	o	o	s/m	+	o
732B	M	o	o	o	o	o	o	o
DA40	H	+	o	+	o	+	+	+
CE9F	M	s/m	s/m	s/m	o	o	s/m	o
D81B	H	o	o	o	o	o	o	+
66BE	M	o	o	o	o	o	o	o
590A	M	o	o	o	o	s/m	o	o
B1A9	H	o	o	o	o	o	o	+
4E1B	H	o	o	o	s/m	+	+	+
EDF5	H	o	o	o	o	o	o	o
8283	M	o	o	o	o	o	o	o
809B	M	o	o	o	s/m	o	o	o
CD05	H	s/m	s/m	s/m	o	s/m	o	o
E7A8	H	o	o	o	o	o	o	o
F103	H	o	o	o	o	o	o	o
7ACO	M	s/m	o	o	o	o	o	o
C9EC	H	o	o	o	o	o	o	s/m

Tabla resumen de muestras analizadas de plasma de bacalao de profundidad que presentan el doblete de aproximadamente 180 kDa correspondiente a Vg, observado en geles de poliácridamida en condiciones desnaturantes. La tabla fue ordenada según fecha del muestreo de cada ejemplar. Se indica con “o” la ausencia del doblete y “+” la presencia éste, la sigla “s/m” indica las fechas sin muestreo.

Es un hecho bien establecido que en todas las especies estudiadas la Vg es una proteína altamente fosforilada (Wallace *et al.*, 1985). Para demostrar que el doblete distintivo encontrado en algunas hembras y fechas efectivamente corresponde a una fosfoproteína, se realizó una tinción fluorescente específica para fosfoproteínas en muestras separadas por electroforesis. Como se muestra en la figura 3A, en las muestras de hembra se observa que de las distintas proteínas solo exhiben fuerte fluorescencia el doblete de bandas de 180 kDa. Este resultado aporta evidencia adicional que el doblete de 180 kDa que se observa en algunas hembras y fechas correspondería a Vg (Figura 3). Con este análisis contamos con un putativo control positivo que servirá de referencia para evaluar especificidad de los anticuerpos específicos desarrollados. En la Figura 3C se muestra el control del experimento, el carril 1 cargado con ovoalbúmina (45 kDa), proteína fosforilada, la cual se utilizó como control positivo. El carril 2 fue cargado con FBPasa recombinante purificada (35 kDa), proteína que no contiene fosforilaciones, la cual se utilizó como control negativo.

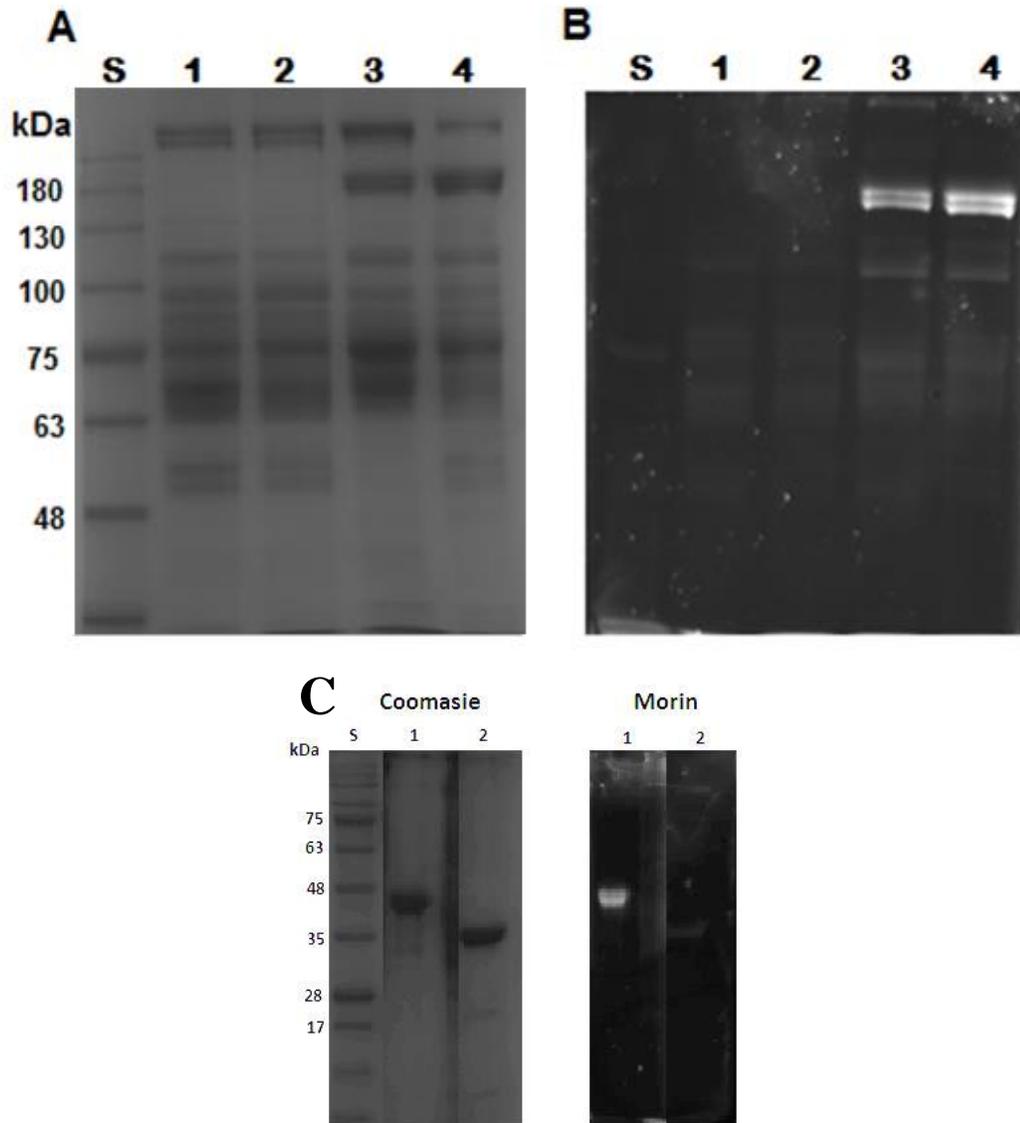


Figura 3: Electroforesis en condiciones desnaturalantes de proteínas plasmáticas de *D. eleginoides*, tinción: Azul de Coomassie y Morin. Los carriles 1 y 2 corresponden a plasmas de ejemplares machos (66BE y F103), mientras que los carriles 3 y 4 corresponden a plasmas de ejemplares hembras (7103 y 4E1B). **A.-** Gel teñido con azul de Coomassie. **B.-** Tinción específica para fosfoproteínas utilizando Morin, este ensayo nos demuestra la existencia del doblete de aproximadamente 180 kDa que está presente en algunas hembras y machos, la cual corresponde a una fosfoproteína. **C.-** Se muestra el control, carril 1 cargado con 3 μ g de ovoalbúmina (45 kDa) considerada como control positivo. Carril 2 fue cargado con 3 μ g de FBPasa (35 kDa) como control negativo. Como estándar de peso molecular se utilizó AccuRuler RGB Prestained Protein Ladder MaestroGen.

2. Preparación y caracterización de proteínas de ovas de *D. eleginoides*

A partir de ovas de bacalao se preparó un extracto crudo de proteínas por homogenización y posterior centrifugación a baja velocidad como se describe en materiales y métodos 2.1. El sobrenadante constituye la preparación cruda de proteínas de ova, de la cual se obtuvo una concentración de proteínas totales de 12,6 mg/ml.

Posteriormente se realizó un análisis electroforético en gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12%, con el cual se evaluó dicho extracto, observándose un patrón de proteínas caracterizado por 2 bandas predominantes de un peso molecular relativo aproximado de 90 y 20 kDa. Por otra parte también se observan bandas de pesos moleculares intermedios a las bandas predominantes, las cuales se observan con una intensidad marcadamente menor con respecto a las bandas descritas anteriormente (Figura 4 carril 1). Esta Figura nos permite evidenciar y tener una idea general de las distintas posibles proteínas presentes en el extracto, evidenciando la existencia de dos bandas predominantes en este extracto proteico de ovas las cuales tienen un peso molecular relativo 90 y 20 kDa.

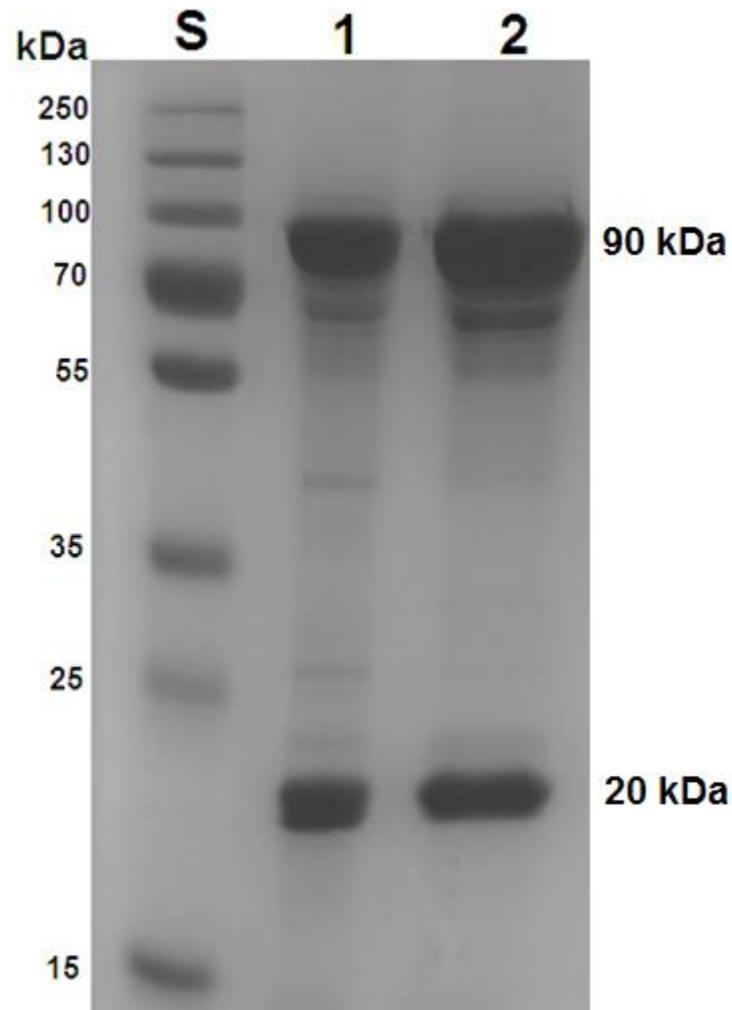


Figura 4: Análisis de extracto proteico de ovas y lipovitelina purificada. La imagen muestra una electroforesis SDS-PAGE al 12%, Carril 1: 20 μ g de extracto de proteínas totales de ovas, carril 2: 20 μ g de proteínas obtenidas del pico cromatográfico (lipovitelina purificada).

2.1. Purificación de lipovitelina

Para purificar lipovitelina, proteína mayoritaria de ovas, se realizó una cromatografía de exclusión molecular utilizando una resina Superdex S200 tal como se describe en el punto 2.2 de materiales y métodos. A partir del cromatograma obtenido (Figura 5), se pudo evidenciar que en condiciones nativas existe un pico notoriamente más abundante en comparación al resto (indicado en un recuadro rojo), el cual representa a la proteína mayoritaria de las ovas.

2.2. Análisis lipovitelina purificada

A partir de la cromatografía de exclusión molecular se pudo aislar la lipovitelina del extracto proteico proveniente de ovas de *D. eleginoides*, esto se hizo separando la fracción cromatográfica correspondiente al pico más abundante. Esta fracción correspondiente a lipovitelina purificada se analizó por electroforesis SDS-PAGE al 12% tal como se muestra en la figura 4. A través de este resultado se pudo observar que las dos bandas más abundantes del perfil electroforético se mantienen en el carril 2, el cual corresponde a la fracción cromatográfica obtenida del pico seleccionado (lipovitelina purificada).

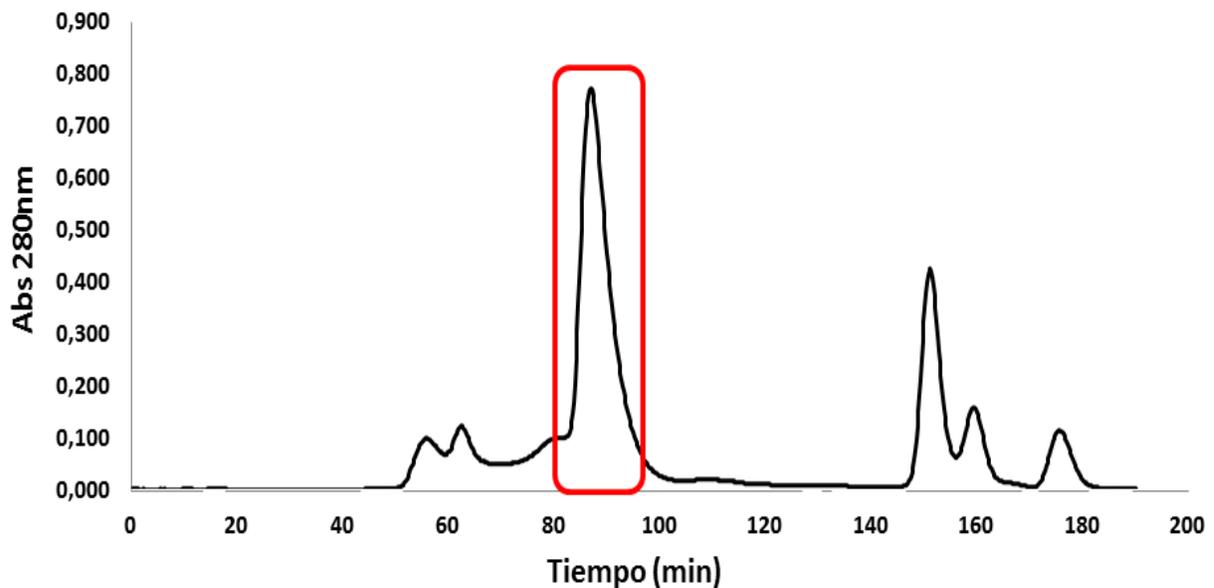


Figura 5: Cromatograma de extracto de proteínas de ovas de *D. eleginoides*. La figura muestra el cromatograma obtenido del extracto de proteínas de ovas de bacalao de profundidad. La purificación se realizó mediante cromatografía de exclusión molecular utilizando una resina Superdex S200 de 140 ml, como fase móvil se utilizó PBS 1X pH 7,5. El recuadro rojo indica el pico más abundante correspondiente a la proteína lipovitelina.

2.3. Peso molecular proteína purificada

Para determinar el peso molecular del pico obtenido por cromatografía de exclusión molecular, se llevó a cabo una curva de calibración utilizando diferentes proteínas de peso molecular conocido. Las proteínas utilizadas para la confección de la curva fueron tiroglobulina, ferritina, catalasa, aldolasa, albúmina, ovoalbúmina y citocromo c; como se puede ver en la Figura 6. A partir de esto, se calculó el peso molecular obteniéndose como resultado un peso molecular de lipovitulina en condiciones nativas de aproximadamente 130 kDa.

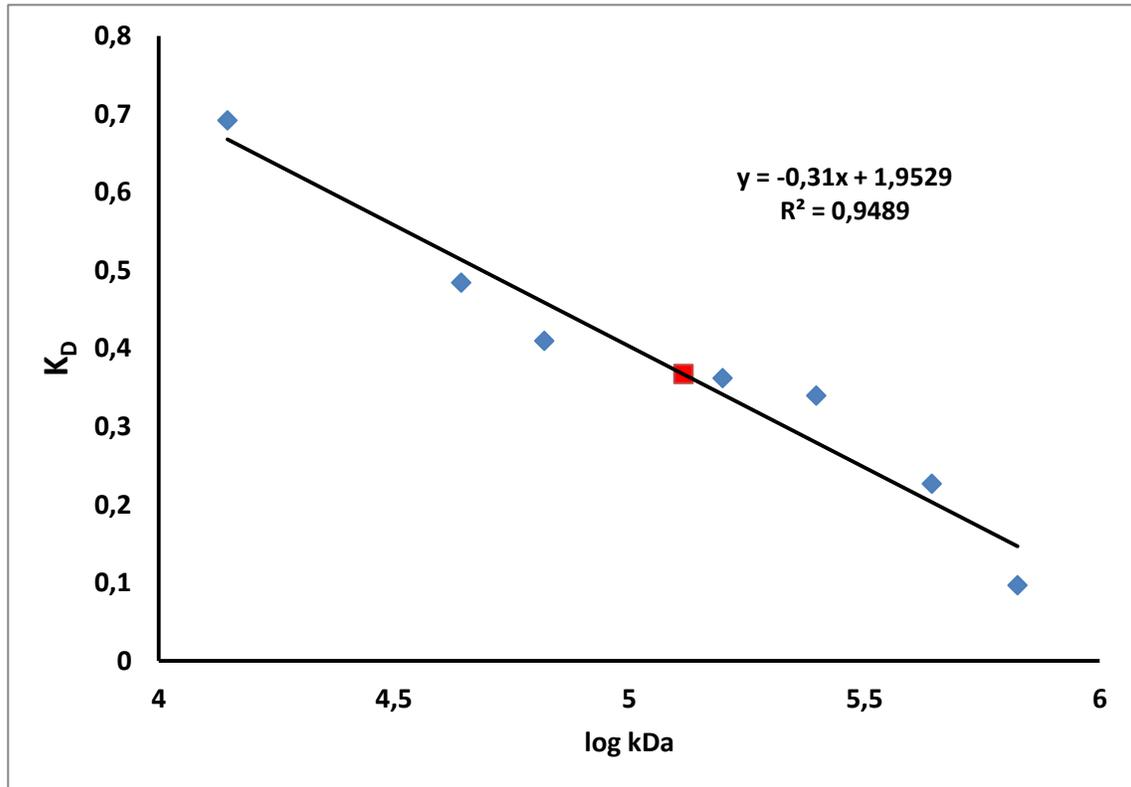


Figura 6: Curva de calibración para determinar el peso molecular de lipovitelina. Se utilizó una columna de silicaBioBasic 300 de 5 μ m, con las siguientes proteínas: Citocromo 14 kDa, Ovoalbumina 44 kDa, Albumina 66 kDa, Aldolasa 158 kDa, Catalasa 250 kDa, Ferritina 440 kDa, Tiroglobulina 669 kDa. El punto rojo que se muestra en la figura, indica el punto correspondiente a lipovitelina, el cual se interpoló en esta curva de calibración obteniéndose un peso molecular aproximado de 130 kDa.

3. Evaluación Antisueros

Los antisueros fueron preparados en conejos utilizando la proteína lipovitelina en condiciones nativas y la banda de 90 kDa de lipovitelina desnaturalada, tal como se describe en la metodología en el punto 2.7.2 y 2.7.3 respectivamente. Considerando que los antisueros preparados son para poder detectar vitelogenina (Vg), los denominamos VgN (antisuero anti-lipovitelina nativa) y VgD (antisuero anti-lipovitelina desnaturalada).

3.1. Evaluación del título de antisueros

Con el fin de evaluar el título de los antisueros obtenidos, se utilizó el ensayo *de Dot Blot*, descrito en detalle en el punto 2.8 de materiales y métodos. Los antisueros VgN y VgD obtenidos de cada conejo, fueron evaluados por separado (Figura 7). Para obtener este resultado, se comparó el título de los antisueros a diferentes diluciones utilizando como antígeno 1 µg y 100 ng de extracto de proteínas de ovas. A partir de esto se pudo observar una notoria diferencia en el título de cada antisuero, siendo el antisuero VgN el que obtuvo un título más elevado comparado con el antisuero VgD. Como control negativo se realizó el mismo procedimiento omitiendo el anticuerpo primario, utilizando el anticuerpo secundario en dos diluciones distintas para evaluar la existencia de uniones inespecíficas provocadas por una alta concentración de éste anticuerpo. Como se muestra en la Figura 7C se observó que utilizando únicamente anticuerpo secundario en una dilución 1:5.000 se generan uniones inespecíficas, no así utilizando este anticuerpo en una dilución 1:20.000 en la cual no se observa reacción en el control negativo. Lo anterior explicaría el por qué se observa reacción positiva en los controles negativos realizados con dilución 1:5.000 de anticuerpo secundario.

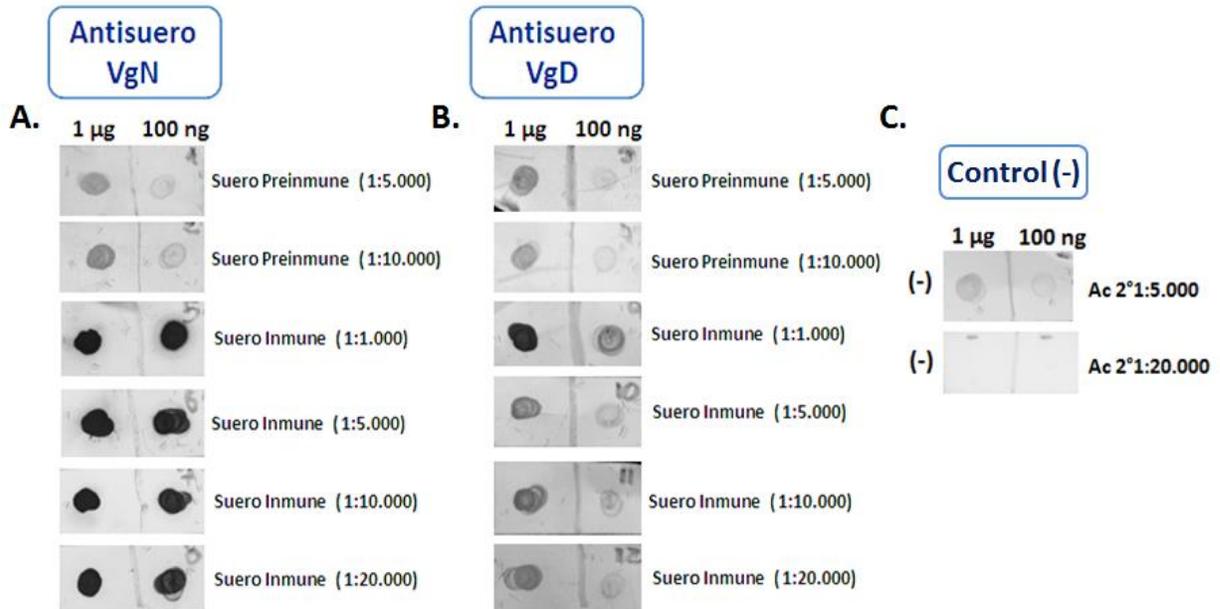


Figura 7: Evaluación del título del antisuero utilizando *Dot Blot*. Como antígeno se utilizó 1 µg y 100 ng de extracto de lipovitelina. **A.-** Corresponde al antisuero VgN, indica que se utilizó como anticuerpo primario el antisuero realizado con la proteína en condiciones nativas. **B.-** Corresponde al antisuero VgD, indica que se utilizó como anticuerpo primario el antisuero realizado con la cadena pesada de lipovitelina en condiciones desnaturalantes. En todos los casos se utilizó como anticuerpo secundario un anticuerpo anti IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina en una dilución 1:5.000. **C.-** En el caso del control negativo se utilizaron dos concentraciones distintas de anticuerpo secundario, omitiendo el anticuerpo primario.

3.2. Evaluación de la especificidad del antisuero contra Vg

La evaluación de la especificidad del antisuero se realizó mediante un análisis de *Western Blot*. Para llevar a cabo esto se utilizó el protocolo descrito previamente en materiales y métodos en el punto 2.9. En este caso para la transferencia se utilizó un gel cargado de igual forma que el mostrado en la Figura 2. Carril 1, 2, 3 y 4 con plasma de hembras positivas para Vg, carriles 5 y 6 cargados con plasmas de hembras negativas y los carriles 7 y 8 fueron cargados con plasmas de ejemplares machos. El resultado de este análisis de *Western Blot* se muestra en la Figura 8. En esta figura se puede observar que el antisuero VgN solo detecta con intensidad un doblete de aproximadamente 180 kDa en los carriles 1, 2, 3 y 4 los que corresponden a las hembras previamente identificadas como positivas. En cambio, tanto en las muestras de hembras consideradas como negativas y los machos, no se detectó ninguna banda. Con esta reacción presente únicamente en el doblete de hembras positivas y no en negativas ni en machos se demostró la alta especificidad por Vg que posee el antisuero generado por el conejo.

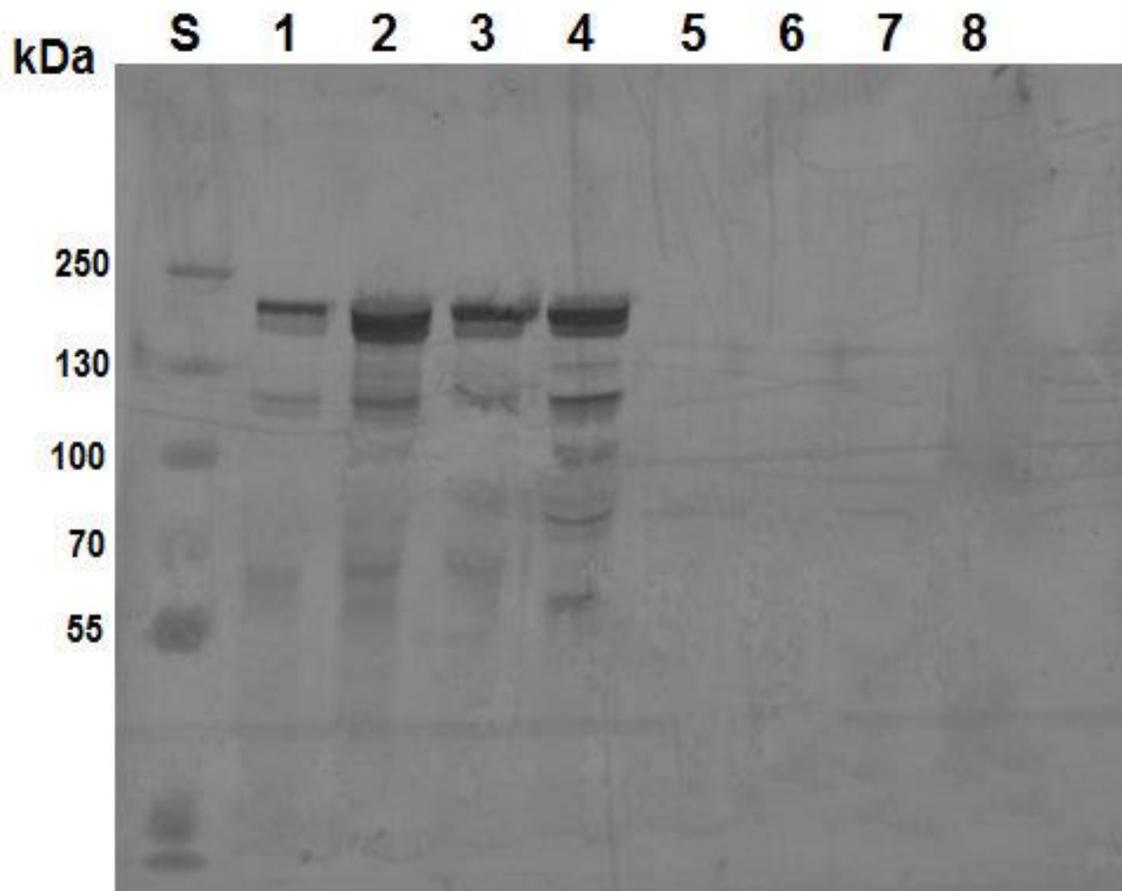


Figura 8: Evaluación especificidad del antisuero por *Western Blot*. Carriles del 1 al 6 corresponden a muestras de plasma de distintas hembras (del 1 al 6: DA40, 4E1B, CO1C, 7103, EDF5, F103). Carriles 7 y 8 corresponden a muestras de plasma de machos distintos (66BE y 8283). Cada carril fue cargado con aproximadamente 18 μ g de proteína de muestra de plasma de bacalao de profundidad. El gel fue transferido y revelado utilizando el antisuero VgN como anticuerpo primario y un anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina, ambos anticuerpos utilizados en una dilución 1:20.000.

4. Estandarización de métodos para detección de Vg en plasma de *D. eleginoides*

4.1. Montaje de ensayo *Dot Blot* para evaluar Vg en plasma de *D. eleginoides*

Para montar este método se utilizó como anticuerpo primario el antisuero VgN en una dilución de 1:20.000, tal como lo describe el protocolo en materiales y métodos en el punto 2.8. En la Figura 9 se muestra el resultado del análisis de plasmas de distintas hembras obtenidos en distintas fechas. Como se puede observar solo se detecta reacción en ciertas hembras y en ciertas fechas. En el caso de la hembra F103, no se detecta reacción en ninguna de las fechas, esto se correlaciona perfectamente con la información obtenida por SDS-PAGE en el cual no se observó la presencia de este doblete característico de aproximadamente 180 kDa, es por esta razón que esta hembra se consideró como control negativo. Del mismo modo, la presencia e intensidad de las bandas en geles SDS-PAGE, se correlacionan perfectamente con la presencia e intensidad de la señal obtenida por *Dot Blot*. Por lo tanto, utilizando esta técnica se puede detectar semicuantitativamente la presencia de Vg en plasma de bacalao de profundidad.

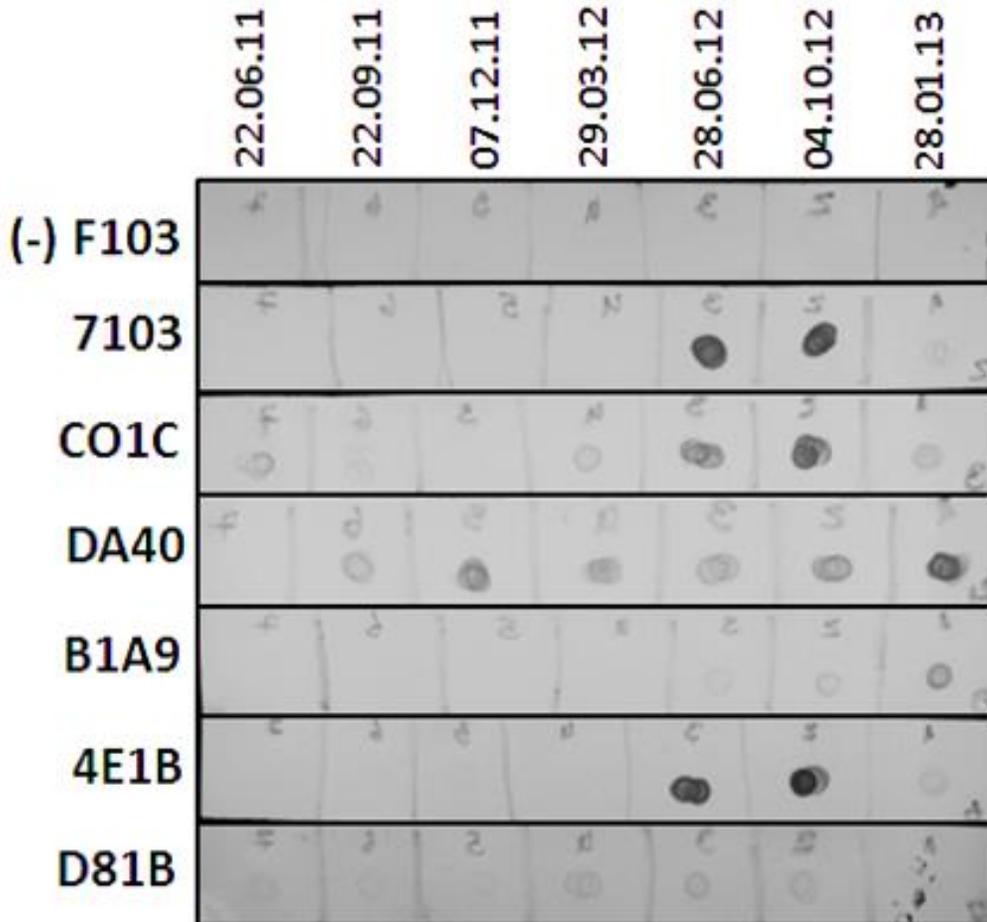


Figura 9: Montaje del ensayo *Dot Blot* para detección de Vg en plasma. Cada casilla contiene 2 μ l de plasma diluido 1:500 en TBS 1X. Al costado izquierdo se indican los códigos de las diferentes muestras de plasma de hembra utilizadas para este análisis. En la parte superior se indican las diferentes fechas en las que fueron tomadas las muestras de plasma. La hembra F130 fue considerada para todo el estudio como control negativo por el hecho de que no se detectó la presencia de la proteína por ningún ensayo realizado.

4.2. Montaje de ensayo ELISA indirecto para cuantificar Vg en plasma de *D. eleginoides*

El montaje del ensayo ELISA indirecto se llevó a cabo con el fin de obtener un método que permita determinar cuantitativamente Vg en plasma de bacalao de profundidad. Para ello fue necesario realizar curvas de calibración, las cuales se llevaron a cabo con lipovitelina purificada (Figura 10). En la Figura 10A se puede observar la curva de calibración considerando todos los puntos realizados, a diferencia de la Figura 10B, en la cual se muestra únicamente la región lineal de la curva con su respectiva ecuación de la recta. A partir de esta curva de calibración fue posible interpolar las absorbancias obtenidas en el ELISA indirecto para así poder calcular la concentración de Vg en cada una de las muestras de plasma de bacalao de profundidad.

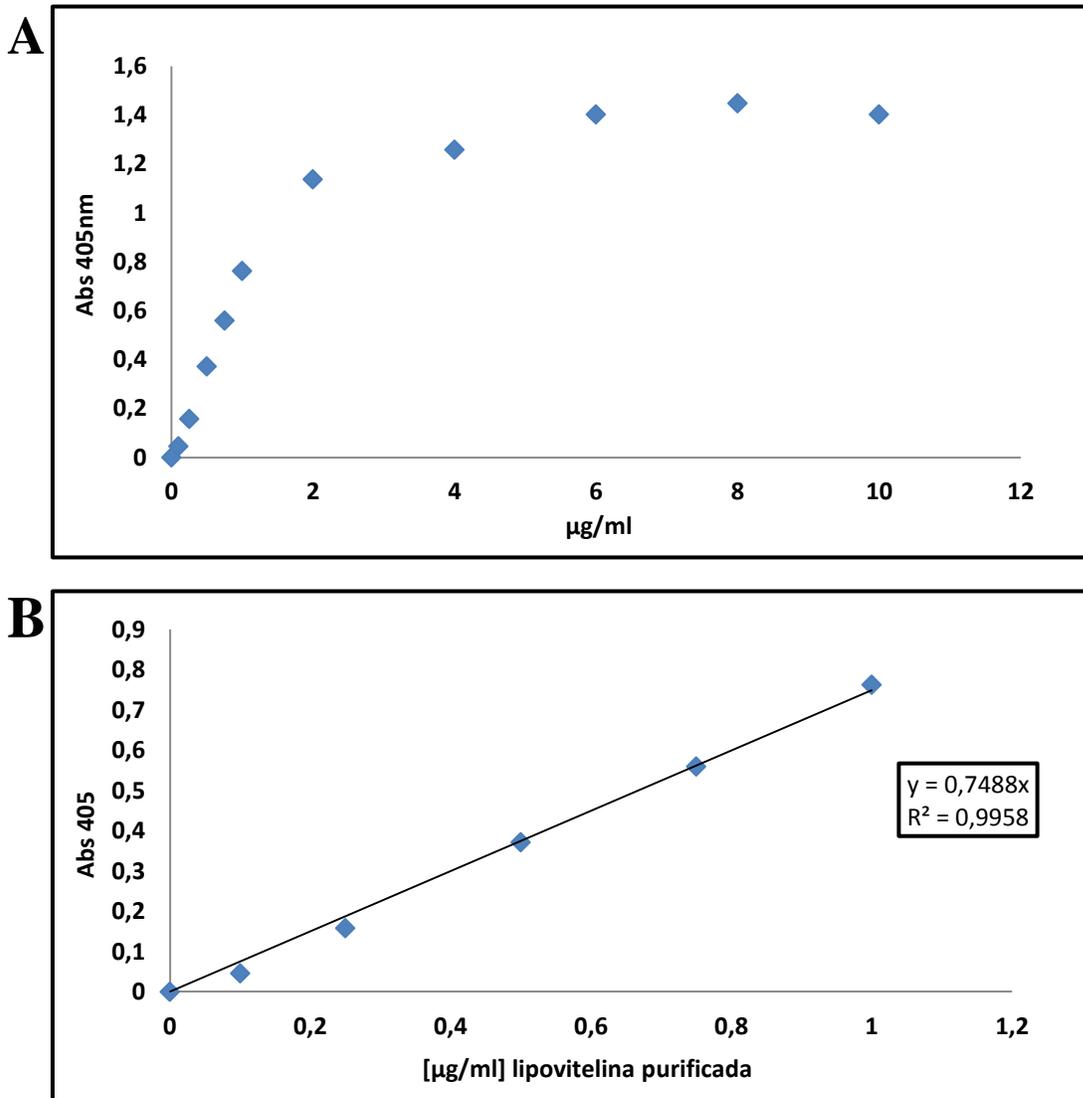


Figura 10: Curva de calibración ELISA indirecto para cuantificación de Vg. **A.-** Muestra una curva de calibración modelo a partir de la cual se seleccionó la región lineal indicada en la figura B. **B.-** A partir de la parte lineal de la curva se obtuvo la ecuación de la recta, con la cual se pudo calcular posteriormente las concentraciones de Vg en las muestras de plasma de *D. eleginoides*. Como estándar se utilizó lipovitelina purificada en distintas concentraciones.

En la Figura 11 se muestra el resultado de la cuantificación de Vg plasmática en muestras obtenida de distintos ejemplares en distintas fechas. Se puede observar que hay ciertas hembras que en ciertas fechas contienen mayor concentración de Vg que en otras.

Comparando este resultado con el obtenido en el ensayo de *Dot Blot* indicado en el punto 4.1 de los resultados, se puede observar que hay una correlación con las concentraciones de Vg obtenidas en ambos casos. Esto nos indica que el resultado obtenido con el ensayo de *Dot Blot* es comparable con el obtenido en el ensayo de ELISA indirecto.

Por otro lado en la Tabla II se pueden ver los valores de las concentraciones obtenidas por ELISA de cada una de las muestras analizadas, valores utilizados para realizar la Figura 11.

En su conjunto los resultados indicarían que la vitelogénesis en ejemplares hembras mantenidas en cautiverio, muestran un periodo de vitelogénesis que va de junio a diciembre enero.

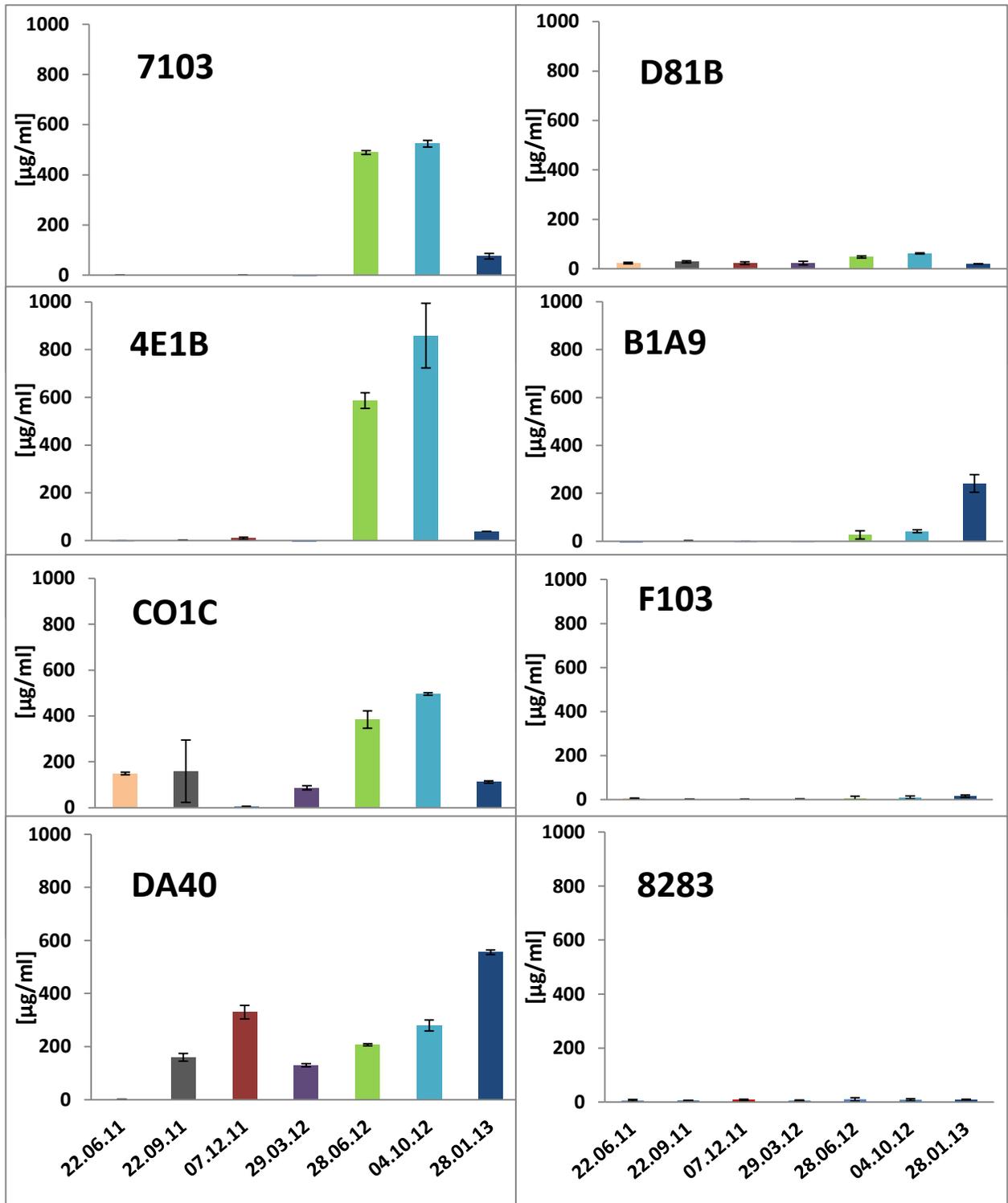


Figura 11: Concentración Vg en distintas muestras determinado por ELISA indirecto. Cada gráfico está individualizado con el código del ejemplar hembra analizado. Los valores de cantidad de Vg presente en cada muestra se obtuvieron interpolando en la curva de calibración indicada en la Figura 10.

Tabla II: Tabla concentraciones Vg en muestras de plasma de *D. eleginoides*

	22.06.11	22.09.11	07.12.11	29.03.12	28.06.12	04.10.12	28.01.13
7103 [$\mu\text{g/ml}$]	0	0	0	0	488	523	75
CO1C [$\mu\text{g/ml}$]	149	159	0	87	384	495	112
DA40 [$\mu\text{g/ml}$]	0	159	329	129	206	279	555
B1A9 [$\mu\text{g/ml}$]	0	1	0	0	29	44	241
4E1B [$\mu\text{g/ml}$]	0	3	12	0	583	852	41
D81B [$\mu\text{g/ml}$]	25	30	25	25	50	64	22
E7A8 [$\mu\text{g/ml}$]	0	0	0	0	0	0	0
F103 (H-)[$\mu\text{g/ml}$]	0	0	0	0	0	0	0
8283 (M)[$\mu\text{g/ml}$]	0	0	0	0	0	0	0

En la tabla se muestran los datos obtenido por el ensayo de ELISA indirecto, se indican las concentraciones en $\mu\text{g/ml}$ de cada hembra en sus diferentes fechas de muestreo.

V. Discusión

El bacalao de profundidad del Pacífico (*Dissostichus eleginoides*) se caracteriza por ser un pez longevo, el cual en la naturaleza comienza recién a desovar a partir de los 8 a 10 años de vida, por tanto, es de vital importancia para fines de cultivo de esta especie, identificar las hembras en etapa de maduración y producción de las ovas, (vitelogénesis). La Vg es la proteína precursora de las principales proteínas de la yema de las ovas, y es sintetizada por el hígado bajo control hormonal (Heppell *et al.*, 1995). Es por ello que la aparición de Vg en el plasma indica que las hembras ovíparas se encuentran en etapa vitelogénica. La Vg una vez sintetizada en el hígado, es secretada al torrente sanguíneo dirigiéndose al ovocito donde sufre proteólisis, dando origen a las proteínas lipovitelina y fosvitina que son los principales componentes del vitelo y representan las proteínas mayoritarias de ovas de peces (Selman y Wallace, 1989).

Para abordar el problema de identificar a las hembras que estén en vitelogénesis, es necesario contar con una herramienta que permita detectar y cuantificar en forma específica la Vg presente en el plasma de estos teleósteos. La cuantificación de esta proteína podría dar información sobre la calidad de las ovas que se formarán, siendo directamente proporcional el aumento de concentración de vitelogenina en plasma con la calidad de las ovas generadas. La mejor alternativa para este fin, es desarrollar un método de detección inmunológico, el cuál sería el método más robusto y preciso para evaluar vitelogénesis, debido a la interacción específica antígeno - anticuerpo que se logra con este método. Otros métodos como por ejemplo medir niveles de hormonas en plasma, como el estradiol y FSH, serían indicativos de que una hembra entre en etapa de vitelogénesis, pero no confirmaría la presencia de dicha proteína en el plasma.

Es por ello que este trabajo apuntó a contribuir con el desarrollo y estandarización de una herramienta complementaria para aportar capacidades predictivas de los desoves de peces reproductores en estanques de cultivo.

Para comenzar este trabajo se realizó un análisis electroforético de proteínas plasmáticas de bacalao de profundidad a partir del cual observamos un patrón común con una gran diversidad de bandas para todas las muestras, tanto de hembras como de machos. Sin embargo, llama la atención la presencia de un doblete característico de aproximadamente 180 kDa en ciertas hembras y sólo en algunas fechas, lo cual permite hipotetizar que correspondería a Vg (figura 2). Esta propuesta se refuerza teniendo presente que una característica de los vertebrados ovíparos, es presentar Vg en el plasma en momentos previos al desove (Redding y Patiño, 1993). El hecho de que el cambio de patrón de bandas en algunas hembras y en ciertas fechas sea por presencia o ausencia de un doblete, contribuye a hacer más robusta la propuesta de que dicho doblete se trate de Vg, esto debido a que se correlaciona a los patrones electroforéticos observados en otras especies semejantes.

Con respecto a la interpretación de este doblete, se ha descrito en otras especies la existencia de dos formas de Vg. Cabe mencionar, que a partir del año 2013 se propuso una nueva terminología utilizada para describir las variaciones de la misma proteína. Esto debido a que en la literatura, se encuentran los siguientes términos: "formas de proteína", "isoformas de proteína", "especies de proteínas" y "variantes de la proteína"; los cuales no son satisfactorios ni son utilizados correctamente en todos los casos. Es por ello que se propuso el término "proteoforma", el cual se utilizaría para describir la forma molecular específica de un producto de proteína derivada de un gen específico.

Esta definición también incluye proteínas que surgen como resultado de la variación genética, splicing alternativo de ARN, y las modificaciones post-traduccionales (Smith *et al.*, 2013). Es por ello, que en adelante se utilizará el término “proteoforma” para describir las diferentes formas moleculares de una proteína.

Incorporando este nuevo termino, podemos comparar el doblete observado en el plasma de *D.eleginoides*, correspondiente posiblemente a dos proteoformas de Vg, con vitelogeninas de otras especies. Se conoce dentro de los teleósteos, la existencia de dos proteoformas de vitelogeninas en especies como *Danio rerio* (Brion *et al.*, 2002), *Verasper moseri* con pesos moleculares de 168 y 175 kDa (Matsubara *et al.*, 1999), en *Oreochromis aureus* de aproximadamente 180 y 130 kDa (Ding *et al.*, 1989) y en *Oreochromis mossambicus* de aproximadamente 200 y 130 kDa (Kishida y Specker 1993). En el caso de tilapia (*Oreochromis niloticus*), se observa el doblete de Vg tanto en hembras como en machos inducidos con estradiol-17 β , teniendo un peso molecular de aproximadamente 130 y 170 kDa cada una (Ndiaye *et al.*, 2006). De igual manera, dos proteoformas de Vg fueron identificadas en el plasma de *Acanthopagrus schlegeli* de peso molecular aparente de 636 y 321 kDa (Chang *et al.*, 1996) y en *Dermochelys coriácea* (Plumel *et al.*, 2013).

Otro punto importante a mencionar es el origen de estas proteoformas, se conoce en *Melanogrammus aeglefinus* la existencia de dos genes distintos para Vg, los cuales dan origen a dos Vg de pesos moleculares 178 y 182 kDa cada una. Una de estas Vg es la que sufrirá proteólisis para posteriormente dar origen a lipovitelina, a diferencia de la otra Vg la cual es degradada completamente a aminoácidos libres (Reith *et al.*, 2001).

Con los antecedentes encontrados en otras especies, se podría especular la posibilidad de que en *D. eleginoides* también existan dos proteoformas de Vg. Además, podemos observar que el peso molecular aparente de la proteína de interés estaría cercano a los pesos moleculares de las vitelogeninas observadas en algunas especies (Kishida y Specker 1993) pero muy alejada a los tamaños de otras (Chang *et al.*, 1996); esto se debe a que las vitelogeninas varían de tamaño dependiendo de la especie según lo descrito por Norberg y Haux (1985).

Por otro lado, para contribuir con la propuesta que el doblete de aproximadamente 180 kDa corresponda a Vg, se llevó a cabo un análisis para detectar fosfoproteínas, esto debido a que es conocido que Vg en otras especies es una proteína altamente fosforilada (Banaszak, 1991). Con este análisis se pudo observar que el doblete de interés efectivamente corresponde a fosfoproteínas (Figura 3). A partir de esto se tomó como criterio la presencia o ausencia de dicho doblete para clasificar las muestras de plasmas de bacalao de profundidad por negativas y positivas para Vg (Tabla I).

Como se señaló en la introducción la estrategia para desarrollar un antisuero específico contra Vg de *D. eleginoides* consistió en aislar la proteína más abundante de las ovas. Ello porque en los peces la ova está constituida mayoritariamente por proteínas del vitelo, las cuales se generan de la Vg plasmática. Con este fin se preparó un extracto de proteínas totales de ovas, homogeneizando ovas maduras de *D. eleginoides*. Al analizar este extracto mediante SDS-PAGE, observamos un patrón de proteínas, en el cual se pueden identificar a simple vista 2 bandas predominantes de un peso molecular relativo de 90 y 20 kDa, además podemos observar otras bandas de pesos moleculares intermedios a las bandas predominantes con una intensidad marcadamente menor

(figura 1A). Estas bandas predominantes podrían corresponder al resultado del corte proteolítico que sufre Vg, siendo éstas bandas dos proteoformas de lipovitelina, considerando que es la proteína más abundante de ovas (Selman y Wallace, 1989).

En otras especies se han observado distintos patrones de bandas analizados por SDS-PAGE correspondientes a extractos proteicos de ovocitos maduros; como en el caso de *Menticirrhus littoralis* en el cual se puede observar cuatro bandas predominantes de 90, 52, 24 y 16 kDa; dicho patrón tiene gran semejanza al de ovas de *D. eleginoides*, debido a que se observa en ambos casos las dos bandas predominantes con tamaños similares, además de las bandas de tamaños moleculares intermedio, observándose éstas últimas con mayor intensidad en el extracto proteico de *M. littoralis* (Greeley *et al.*, 1986). Los patrones electroforéticos estudiados en *D. eleginoides*, indican que los pesos relativos de las proteínas de ovas se encuentran dentro de los rangos de estudios realizados en otras especies como tilapia (*Oreochromis mossambicus*) (Johanning y Specker, 1995) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Tyler, 1993). Diferente es el caso de *Fundulus heteroclitus*, en el cual se observa un patrón distinto en cuanto a su extracto proteico obtenido de las ovas, pudiéndose observar cinco bandas predominantes con pesos moleculares relativos de 103, 77, 75, 42 y 19 kDa (LeFleur *et al.*, 2005). De Vlaming *et al.* (1980) revelaron la existencia de dos cadenas polipeptídicas para lipovitelina en carpa dorada (*Carassius auratus*): LV1 (110 - 105 kDa) y LV2 (25 - 19 kDa) lo que se correlaciona con los resultados obtenidos de este trabajo. En *D. eleginoides* las bandas de alto y bajo peso podrían ser análogas a LV1 y LV2 encontrada en las especies anteriormente mencionadas.

Por otra parte, se logró una purificación parcial de lipovitelina por cromatografía de exclusión molecular a partir del extracto proteico de ovas de *D. eleginoides*. El criterio que se usó para la purificación fue colectar el pico más abundante de la cromatografía (figura 4), debido a que este correspondería a la proteína mayoritaria de la muestra en ovas (lipovitelina). Se estimó el peso molecular de lipovitelina en condiciones nativas obteniéndose como resultado un peso molecular aproximado de 130 kDa. Tras la purificación parcial de lipovitelina, se pudo observar por análisis electroforéticos que se mantienen las dos bandas predominantes de 90 y 20 kDa (figura 6) estando ausentes las bandas de tamaños intermedios. En cuanto a la posible estructura de lipovitelina se puede decir que el hecho de que la proteína en condiciones nativas tenga un peso molecular aproximado de 130 kDa y en un gel en condiciones desnaturalantes se vea más de una banda, indicaría que ésta proteína se trata de un multímetro, lo que nos estaría sugiriendo una evidencia de su posible estructura cuaternaria. Soporte adicional a esta conclusión nos entrega un ensayo electroforético utilizando una muestra de lipovitelina purificada sin ser tratada previamente con β -mercaptoetanol, en el cual se pudo observar que el patrón de las bandas no varió con respecto a la muestra tratada con β -mercaptoetanol (datos no mostrados), lo que nos da cuenta que no hay presencia de puentes disulfuros en la lipovitelina nativa. Además, la suma de los pesos de ambas bandas dan un tamaño menor al de la proteína en condición nativa, lo que da cuenta que esta proteína posiblemente contenga más de dos subunidades. Lo anterior explicaría el tamaño en condiciones nativas cercano a los 130 kDa, y de sus subunidades en condiciones desnaturalantes de 90 y 20 kDa.

Un punto clave de este trabajo fue el hecho de que fue posible generar un antisuero de alto título y específico para Vg. Tal como se observa en el ensayo de *Dot Blot* en la figura 7, el antisuero utilizado para llevar a cabo el ensayo de ELISA indirecto (antisuero VgN), presenta un alto título debido a que en una dilución 1:20.000 se puede observar intensamente la reacción antígeno-anticuerpo; lo que permitiría detectar señal con diluciones aún mayores a 1:20.000 del antisuero VgN, además se observó un título marcadamente mayor en comparación con el antisuero VgD. La diferencia en el título entre ambos antisueros puede deberse a la estructura de las proteínas con las cuales fueron inmunizados los conejos. La proteína en condiciones nativas, al mantener su estructura cuaternaria, dio origen a anticuerpos con diversos epítopes, los cuales fueron capaces de reconocer eficientemente Vg. A diferencia del antisuero VgD el cual fue generado usando la banda pesada de lipovitelina, este no habría generado anticuerpos para tantos epítopes distintos como en el caso del antisuero VgN, o habría generado anticuerpos contra epítopes que no están accesibles en la proteína nativa. Lo anterior explicaría la notoria diferencia en el título de ambos antisueros, siendo el antisuero VgN un excelente antisuero para llevar a cabo los inmunoensayos. En este mismo ensayo de *Dot Blot* se puede observar reacción en las casillas correspondientes a sueros pre inmunes y control negativo (sin anticuerpo primario), esto debido a la alta concentración en que se está utilizando el anticuerpo secundario, lo que estaría posiblemente generando interacciones inespecíficas. Esto se demostró utilizando diluciones más altas del anticuerpo secundario (figura 7 control), en el cual este tipo de falso positivo no ocurría.

La alta especificidad del antisuero VgN fue demostrada en la Figura 8 mediante un ensayo de *Western Blot*. Se puede observar bandas de aproximadamente 180 kDa únicamente en las muestras de plasma de hembras consideradas positivas, no así en las hembras negativas ni en machos. Lo que demostraría su especificidad por la proteína Vg a la cual se desea detectar. Las bandas de menor intensidad que se observan a partir de los 130 kDa hacia abajo, podrían corresponder a degradación de la misma proteína.

Los resultados mostrados en este trabajo dan cuenta del desarrollo de un método inmunológico para detectar y cuantificar Vg en plasma de *D. eleginoides*. El método realizado fue un ELISA indirecto, este tipo de ensayos de inmunodetección ya han sido montados para cuantificar Vg en plasma de otras especies, como por ejemplo en el lenguado (*Solea vulgaris*) (Nuñez Rodríguez *et al.*, 1989), en *Tor tambroides* (Muhammad *et al.*, 2011), en la carpa (*Cyprinus carpio*) y en la perca (*Perca fluviatilis*) (Hennies *et al.*, 2003). Este montaje es muy beneficioso para la industria acuícola, por el hecho de que *D. eleginoides* en particular desova por primera vez a una edad muy avanzada. Es por ello que es de gran ayuda tener un método que permita identificar el momento en que las hembras estén previas a la ovoposición.

Un número de diferentes técnicas han sido usadas para detectar niveles de Vg en sangre. Recientemente diferentes inmunoensayos se han desarrollado para la medición de Vg en diferentes especies (Fukada *et al.*, 2001). Estos ensayos son costosos y limitados en su uso debido a la falta de anticuerpos específicos de especies. El hecho que los anticuerpos contra Vg deban diseñarse para cada especie de manera específica, puede ocasionar que la generación de anticuerpos sea costosa, requiriendo

la caracterización y aislamiento de cada proteína de Vg para cada especie ensayada (Medina, 2012). Es por ello que sería de gran ayuda poder generar en el futuro un anticuerpo utilizando una secuencia conservada de Vg que sea capaz de detectarla en el plasma de un grupo de distintas especies.

Es importante enfatizar que se observó una perfecta correlación entre los resultados entregados por SDS-PAGE, *Dot Blot*, *Western Blot* y ELISA indirecto. Las muestras positivas presentaron un doblete visible de aproximadamente 180 kDa en análisis electroforéticos; una reacción positiva en ensayo de *Dot Blot*; reacción positiva en *Western Blot* de la banda correspondiente a Vg en membranas transferidas de SDS-PAGE y señal positiva en ensayo de ELISA indirecto. Cada una de estas señales positivas, sus intensidades y cuantificaciones se correlacionaron perfectamente en todos los casos. Del mismo modo las muestras que se consideraron negativas por SDS-PAGE, fueron consideradas negativas por todos los ensayos anteriormente mencionados (datos no mostrados). Lo anterior daría cuenta que los métodos utilizados y la técnica montada para detección de Vg, entrega resultados coherentes a los obtenidos por otros métodos analizando las mismas muestras.

Por otro lado, es importante aclarar que los niveles de Vg encontrados en las muestras de plasma analizadas fueron variados. Se pudo ver un patrón común en algunas hembras en que sus niveles de Vg aumentaron considerablemente entre junio y octubre alcanzando un rango de concentración entre 400 y 850 $\mu\text{g/ml}$ en algunos ejemplares. Diferenciándose al resto del año de dichos ejemplares, donde se encontraron concentraciones no superiores a los 160 $\mu\text{g/ml}$. En otras especies como en lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) se observa de igual modo un aumento en la

concentración de Vg en plasma en una época el año. En esta especie se encuentran concentraciones sobre los 400 µg/ml entre febrero y abril, encontrándose el resto del año concentraciones no superiores a los 100 µg/ml (Agulleiro M., 2008).

Con respecto a la cuantificación de Vg en plasma, podemos decir que además de servir como predictor de madurez sexual, puede dar cuenta de los niveles de contaminantes en el hábitat. Esto debido a que estudios han demostrado que las alteraciones en la síntesis de Vg y en la diferenciación de sexo, pueden ocurrir en respuesta de los estrógenos contaminantes de las aguas en que habitan estas especies. Los peces machos también contienen el gen de la Vg, y la exposición a estrógenos puede provocar su expresión, resultando en concentraciones detectables de la proteína en el plasma sanguíneo (Brasfield et al., 2002). Diversos estudios utilizando Vg, han demostrado la presencia de químicos estrogénicos en los ecosistemas acuáticos (Kime et al., 1999). Un ejemplo es el caso de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), en esta especie se ha demostrado que al estar expuesta incluso una semana a efluentes es suficiente para producir un aumento de 300 veces de la concentración de Vg en plasma. Esto probablemente se debe a que el afluente contenía sustancias estrogénicas, las cuales indujeron la síntesis de Vg (Sumpter y Jobling, 1995). En otras especies como es el caso de la carpa (*Cyprinus carpio*), se ha evaluado la presencia de Vg en plasma observándose la presencia de esta proteína tanto en hembras como en machos, esto debido a que el ambiente en el que habitan estas especies están expuestos a contaminantes estrogénicos; lo que estaría induciendo la síntesis de Vg tanto en hembras como en machos (Folmar et al., 1996). En el caso de nuestro trabajo, las muestras de plasma de los ejemplares machos fueron todas negativas para Vg. Los

ejemplares de los cuales se extrajeron las muestras de plasma, se encontraban en cautiverio con agua de mar circulante en condiciones controladas, no obstante, no se conoce con certeza al tipo de contaminantes a los que pueden haber estado expuestos estos individuos. Sin embargo, el hecho de que todas las muestras de machos analizadas sean negativas, sugiere que el agua que se utiliza en los estanques en que se mantienen estos peces se encontraba libre de contaminantes estrogénicos.

Finalmente con los resultados obtenidos de este trabajo resultaría interesante a futuro continuar analizando muestras de plasma de bacalao de profundidad por un periodo de tiempo prolongado. Con lo cual sería posible identificar el periodo en el año en el cual se encuentra una mayor concentración de Vg en plasma. Lo que nos daría un dato importante para señalar cual es la etapa de desove de esta especie. Para llevar a cabo esto sería necesario tener muestras de al menos dos años de diferentes ejemplares con varios muestreos anuales. También sería interesante como siguiente paso validar la técnica, contar con la proteína purificada para estandarizar sensibilidad y reproductividad del método. Por otro lado continuar estudiando, identificar y caracterizar la proteína Vg de esta especie para poder decir fehacientemente que este análisis evalúa Vg, para posiblemente crear un kit para cuantificación de Vg en *D. eleginoides*. A partir de esto sería interesante poder evaluar de manera indirecta posibles contaminantes estrogénicos provenientes de las aguas en que habitan estos ejemplares.

Para finalizar este trabajo podemos decir que se logró purificar desde ovas de *D. eleginoides* un potente inmunógeno que permitió desarrollar un antisuero de alto título y altamente específico, que reconoce una proteína específica en el plasma de hembras

que posee todas las características de Vg. Con estos resultados observados pudimos probar nuestra hipótesis, siendo lipovitelina un buen antígeno para desarrollar un antisuero que detecte Vg en plasma de bacalao de profundidad. Por otro lado, con este anticuerpo fuimos capaces de desarrollar un ensayo de ELISA indirecto que permite cuantificar de forma sencilla y rápida Vg presente en el plasma de ejemplares de *D. eleginoides*. Este ensayo de ELISA indirecto resulta ser una útil herramienta para monitorear el proceso de vitelogénesis en esta especie.

VI. Bibliografía

- Arana, P. (2009)** Reproductive aspects of the Patagonian toothfish (*Dissostichus eleginoides*) off southern Chile. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 37(3): 381-394.
- Agulleiro M. (2008)** Fisiología de la reproducción del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*): mecanismos endocrinos y aplicaciones en acuicultura. Tesis doctoral Facultad de ciencias biológicas. Departamento de Genética Molecular y Evolutiva. Universidad de Valencia.
- Aqua (2013)**. Compendio de acuicultura y pesca de Chile. *Aqua, acuicultura + pesca*. <http://www.aqua.cl/wp-content/uploads/sites/3/2014/01/muestra-CAP-20132.pdf>.
- Báez, N.A. (2004)**. Análisis de posibles sitios de unión para Apolipoproteína A-I en membranas de ribete en cepillo aisladas del intestino del pez *Cyprinus carpio*. Tesis de pregrado, Escuela de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.
- Banaszak L., Sharrock W., Timmins P. (1991)** Structure and function of a lipoprotein: lipovitellin. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 20:221-246.
- Brasfield S., Weber L., Talent L., y Janz, D. (2002)** Dose-response and time course relationships for vitellogenin induction in male western Fence Lizards (*Sceloporus occidentalis*) exposed to ethinylestradiol. *Environ. Toxicol. Chem.* 21:1410-1416.
- Brion F., Nilsen B., Eidem J., Gokoyt A., Porcher J. (2002)** Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol. Chem.* Vol. 28, No. 8. 1699–1708.
- Bolte, G., Knauss, M., Metzdorf, I., Stern, M. (1997)** Dot blot chemiluminescence assay for studying food protein binding to small intestinal brush border membranes in vitro. *J. Biochem. Biophys.* 34:189–203.

- Burnette W. (1981)** "Western Blotting": Electrophoretic Transfer of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A. *Anal. Biochem.* 112, 195-203.
- Chang C., Lau E., Lin B., Jeng S. (1996)** Characterization of vitellogenin induced by estradiol-17 β in protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. *Fish Physiol Biochem.* vol. 15 n°1. 11-19.
- Cheek A., King V., Burse J., Borton D., Sullivan C. (2004)** Bluegill (*Lepomis macrochirus*) vitellogenin: purification and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of endocrine disruption by papermill effluent. *Comp Biochem Phys c.* 137, 249-260.
- Collins, M., Brickle, P., Brown, J., Belchier, M. (2010)** The Patagonian Toothfish: Biology, Ecology and Fishery. *Adv. Mar. Biol.* 227-300.
- Cubillos L. y Araya M. (2007)** Estimaciones empíricas de mortalidad natural en el bacalao de profundidad (*Dissostichus eleginoides* Smitt, 1898). *Rev. Biol. Mar. Oceanog.* 42(3): 287-197.
- de Vlaming, V., Wiley H., Delahunty G., Wallace R. (1980)** Goldfish (*Carassius auratus*) vitellogenin: Induction, isolation, properties and relationship to yolk proteins. *Comp. Biochem. Physiol. [B]*, 67 613-623.
- Ding I., Lee P., Lam T. (1989)** Two forms of vitellogenin in the plasma and gonads of male *Oreochromis aureus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 93B: 363-370.

Folmar L., Denslow N., Rao V., Chow M., Crain D., Enblom J., Marcino J., Guillette L. (1996) Vitellogenin Induction and Reduced Serum Testosterone Concentrations in Feral Male Carp (*Cyprinus carpio*) Captured Near a Major Metropolitan Sewage Treatment Plant. *Environ health persp.* 104:1096-1101.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2012) El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO.

Fukada H., Haga A., Fujita T., Hiramatsu N., Sullivan C., Hara A. (2001) Development and validation of chemiluminescent immunoassay for vitellogenin in five salmonid species. *Comp. Biochem. Physiol Part A* 130:163-170.

García de la Rosa S., Sánchez F., Figueroa D. (1997) Comparative feeding ecology of patagonian toothfish (*Dissostichus eleginoides*) in the southwestern atlantic. *CCAMLR Sci.* 4:105-124

Greeley M., Calder D., Wallace R. (1986) Changes in teleost yolk proteins during oocyte maturation: correlation of yolk proteolysis with oocyte hydration. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol.84 B, N°1. 1-9.

Guzmán, C. (2003) Análisis de los niveles de vitelogenina séricas en individuos neomachos de trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*. Tesis de pregrado, Escuela de Biología Marina, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

Hennies M., Wiesmann M., Allner B., Sauerwein H. (2003) Vitellogenin in carp (*Cyprinus carpio*) and perch (*Perca fluviatilis*): purification, characterization and development of an ELISA for the detection of estrogenic effects. *Sci Total Environ.* 309:93-103

- Heppell S., Denslow N., Folmar L., Sullivan S. (1995)** Universal Assay of Vitellogenin as a Biomarker for Environmental Estrogens. *Environ Health Perspect.*,103(7):9-15.
- Idler D., Campbell C. (1980)** Gonadotropin stimulation of estrogen and yolk precursor synthesis in juvenile rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* 41, 384-391.
- Johanning K., Specker J. (1995)** Characterization of yolk proteins during oocyte development of tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol.112B, N°2. 177-189.
- Kime D., Nash J., Scott A. (1999)** Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics. *Aquaculture*, 345-352.
- Kishida M., Specker K. (1993)** Vitellogenin in tilapia (*Oreochromis mossambicus*): Induction of two forms by estradiol, quantification in plasma and characterization in oocyte extract. *Fish. Physiol. Biochem.* vol12 N°3. 171-182.
- Kris-Etherton P., Harris W., Appel L. (2002)** Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circ. J.* 106:2747-2757.
- Kock K. (1985)** Marine habitats - Antarctic fish. In: Bonner WN, Walton DWH (eds) Key environments: Antarctica. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 437–444.
- LaFleur G., Raldúa D., Fabra M., Carnevali O., Denslow N., Wallace R., Cerda J. (2005)** Derivation of Major Yolk Proteins from Parental Vitellogenins and Alternative Processing During Oocyte Maturation in *Fundulus heteroclitus*. *Biol Reprod.* 73:815-824.
- Laemmli U.(1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (London) 227:680-685.

Lack M. (2008) Continuing CCAMLR'S fight against IUU fishing for toothfish. WWF Australia and TRAFFIC International.

http://awsassets.wwf.org.au/downloads/fs002_g_traffic_continuing_ccamlrs_fight_30oct08.pdf

Le Bail P., Breton B. (1981) Rapid determination of the sex of puberalsalmonid fish by a technique of immunoagglutination. *Aquaculture* 22:367-375.

Matsubara T., Ohkubo N., Andoh T., Sullivan C., Hara A. (1999) Two forms of vitellogenin, yielding two distinct lipovitellins, play different roles during oocyte maturation and early development of barfin flounder, *Verasper moseri*, a marine teleost that spawns pelagic eggs. *Dev Biol* 213:18-32.

Medina H. (2012) Uso de biomarcadores en peces como herramienta para evaluar la exposición y efecto de contaminantes ambientales en cuerpos de agua. Tesis postgrado. Facultad de ciencias químicas, ingeniería y medicina. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Programas multidisciplinarios de posgrado en ciencias ambientales. Tesis para obtener el grado de maestría en ciencias ambientales.

Moreno C., Hucke-Gaete R., Arata J. (2003) Interacción de la pesquería del bacalao de profundidad con mamíferos y aves marinas. Proyecto FIP N°2001-31.

Muhammad N., Christianus A., Daud S., Saad C., Harmin S., Ina-Salwany M. (2011) Estrogen-Induced Vitellogenin in *Tor tamboides* (Bleeker, 1854): Purification, Characterization and ELISA Development. *J. Fish. Aquat. Sci.*, 6 (7):700-714.

Ndiaye P., Forgue J., Lamothe V., Cauty C., Tacon P., Lafon P., Davail B., Fostier A., Le Menn F., Núñez J. (2006) Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Vitellogenins:

Development of Homologous and Heterologous ELISAs and Analysis of Vitellogenin Pathway Through the Ovarian Follicle. *J. Exp. Zool.* 305A:576–593.

Norberg B., Haux C. (1985). Induction, isolation and a characterization of the lipid content of plasma vitellogenin from two salmo species: rainbow trout (*salmo gairdneri*) and sea trout (*salmo trutta*). *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 81B, N°4. 869-876.

Nuñez Rodriguez J., Kah O., Geffard M., Le Menn F. (1989) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for sole (*solea vulgaris*) vitellogenin. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 92B, N°4. 741-746.

Patiño R. (1997) Manipulations of the Reproductive System of Fishes by Means of Exogenous Chemicals., *Prog. Fish. Cult.* 59:2. 118-128.

Plumel M., Wasselin T., Plot V., Strub J., Dorselaer A., Carapito C., Georges J., Bertile F. (2013) Mass Spectrometry-Based Sequencing and SRM-Based Quantitation of Two Novel Vitellogenin Isoforms in the Leatherback Sea Turtle (*Dermochelys coriacea*). *J. Proteome Res.* 12: 4122–4135.

Ramírez, B. (2012) Visión Marítima de Chile. Estudios hemisféricos y polares. Vol. III 151-173.

Redding J., Patiño R (1993). Reproductive physiology. In: Evans DH, editor. The physiology of fishes. *Marine Science*, 503-534. 592 pp.

Reigler, E. (1914) Eine kolorimetrische Bestimmungsmethode des Eiweisses. *Z. Anal. Chem.* 53:242–254.

Reith M., Munholland J., Kelly J., Nigel Finn R., Jorgen Fyhn H. (2001) Lipovitellins Derived From Two Forms of Vitellogenin Are Differentially Processed During Oocyte

Maturation in Haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 291:58–67.

Reyes A., Kido R., Moreno A. (2012) Capture and maintenance of *Dissostichus eleginoides* to establish a broodstock group. *Lat. Am. Aquat. Res.*, 40(4):1066-1071.

Selman, K., Wallace, R. (1989) Cellular Aspects of Oocyte Growth in Teleosts. *Zool Sci.*,6:211-231.

Silva, K. (2010) Proyecto pionero a nivel mundial: Chile se prepara para liderar el cultivo del bacalao de profundidad. *Mundoacuícola y pesquero*, Edición N° 72, 6-8.
<http://issuu.com/mundoacuicola/docs/edicion72?e=1738024/3213411>

Smith L., Kelleher N., The Consortium for Top Down Proteomics (2013) Proteoform: a single term describing protein complexity. *Nature*. Vol.10 N°3 186-187.

Stifani, S., Nimpf, J. and Scheider W.J. (1989) Vitellogenesis in *Xenopus laevis* and Chicken: Cognate Ligands and Oocyte Receptors. *J Biol Chem.* 265:882-888.

Stifani S., Barber D., Nimpf J., Schneider W. (1990) A single chicken oocyte plasma membrane protein mediates uptake of very low density lipoprotein and vitellogenin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:1955-1959,

Sumpter J., Jobling S. (1995) Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ Health Perspect.* 103:173–178.

Tyler C., Santos E., Prat F., (2000) Unscrambling the egg - cellular, biochemical, molecular and endocrine advances in oogenesis. En: "Proceedings of the Sixth International Symposium Of Reproductive Physiology of Fish"

Tyler C. (1993) Electrophoretic patterns of yolk proteins throughout ovarian development and their relationship to vitellogenin in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 106B, N°2. 321-329.

Van Bohemen Ch., Lambert J. (1981) Estrogen synthesis in relation to estrone, estradiol and vitellogenin plasma levels during the reproductive cycle of the female rainbow trout, *Salmogairdneri*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 45:105-114.

Wallace R. and Begovac P. (1985) Phosvitins in *Fundulus* Oocytes and Eggs. *J Biol Chem.* 260:11268-11274.

Wang X., Hwang S., Cong W., Jin L., Choi J. (2013) Phosphoprotein staining for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis using fluorescent reagent morin hydrate. *Anal. Biochem.* 432; 19-26.

Whitehead C., Bromage N. R, and Forster J. R. M. (1978) Seasonal changes in the reproductive function of the rainbow trout, *Salmogairdneri*. *J. Fish Biol.* 12, 601-608.

Young Z., Oliva J., Olivares A., Díaz E. (1999) Aspectos reproductivos del recurso de bacalao de profundidad en la I a X regiones. Instituto de fomento pesquero.