

Año 12, PCTI 193-2021-09-12

## Caracterización proteica de huevos de jurel en cautiverio como biomarcadores tempranos de calidad de huevos y larvas

Vania Serrano-Pinto

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR),

[vserrano04@cibnor.mx](mailto:vserrano04@cibnor.mx)

Biotecnología y Ciencias Agropecuarias

### Abstract

The objective of the project was to study the expression of the proteins involved in the embryonic process of horse mackerel *Seriola rivoliana*. Proteomic characterization of fertilized eggs was performed using two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. Different vitellogenin proteins A, B, C and Ab,  $\beta$ -actin, peroxiredoxin, superoxide dismutase 1, alpha subunit proteasome, keratin I and II were identified. According to their functions, related to embryonic development, energy metabolism, protein synthesis, cell structure, and cytoskeleton, some of them are antioxidant proteins, with defense enzymatic activity; possibly associated with oxidative stress on eggs under captive conditions. **Keywords:** fish eggs proteomics, *Seriola rivoliana*, proteomic biomarkers, horse mackerel.

### Resumen

El objetivo del proyecto fue estudiar la expresión de las proteínas involucradas en el proceso embrionario del jurel *Seriola rivoliana*. Se realizó la caracterización proteómica de huevos fertilizados, mediante electroforesis bidimensional y espectrometría de masas. Se identificaron diferentes proteínas vitelogenina A, B, C y Ab,  $\beta$ -actina, peroxiredoxina, superóxido dismutasa 1, proteosoma subunidad alfa, queratina I y II. De acuerdo con sus funciones, relacionadas con el desarrollo embrionario, el metabolismo energético, la síntesis de proteínas, la estructura celular y citoesquelética, algunas de ellas son proteínas antioxidantes, con actividad enzimática de defensa; posiblemente asociadas con el estrés oxidativo en los huevos bajo condiciones de cautiverio. **Palabras clave:** proteómica de huevos de peces, *Seriola rivoliana*, biomarcadores proteómicos, jurel.

### Problemática

Para generar nuevo conocimiento útil, se requiere conocer información de las proteínas expresadas en los huevos fertilizados del jurel, debido a que los cultivos en México actualmente subsisten a partir de la recolecta de juveniles silvestres, práctica que se lleva a cabo por la gran dificultad de mantener la etapa larvaria en esta especie.

### Usuarios

Las granjas acuícolas nacionales e internacionales que podrán contar con información relacionada con las proteínas expresadas en los huevos fertilizados del jurel, para su cultivo de manera exitosa.

### Introducción

El jurel es un pez pelágico nerítico y oceánico de amplia distribución con una importante pesca y acuicultura en México. Actualmente su cultivo se encuentra en fase de desarrollo y representa la segunda industria más importante del cultivo de peces marinos en México (Montes 2007); por lo cual, se considera una especie con gran potencial para el cultivo de peces marinos en este país y con altas expectativas de crecimiento. Sin embargo, para convertirse en una actividad económicamente viable y ecológicamente sostenible se requiere su cultivo artificial. Las granjas de jurel mexicanas concesionadas se encuentran en Ensenada, Baja California; en La Paz y Bahía Magdalena, Baja California Sur; Bahía Kino, Sonora, además de tres permisos para la acuicultura de fomento en este Estado (Instituto Nacional de Pesca. 2018). Para el éxito del cultivo, se necesita tener una producción constante y sostenida de huevos y larvas de jurel de

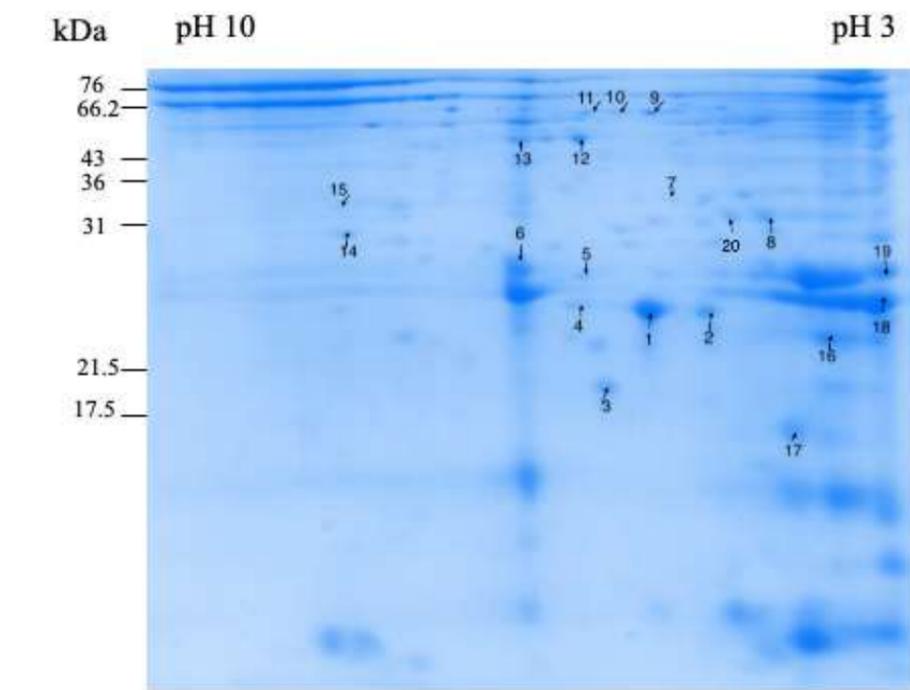


Figura 1. Imagen de electroforesis bidimensional del perfil de proteínas de huevos de *Seriola rivoliana*. Vitelogeninas (Vtg): A (punto 10), B (puntos 18 y 19), C (puntos 1, 2, 4, 8 y 16) y Ab (puntos 6, 9, 11, 12);  $\beta$ -actina (puntos 13, 14 y 15), peroxiredoxina (punto 5), superóxido dismutasa 1 (SOD1) (puntos 3 y 17), subunidad alfa del proteosoma (punto 7), queratina I y queratina II (punto 20).

buena calidad bajo condiciones controladas. Sin embargo, el ciclo completo de reproducción del jurel ha sido difícil de lograr debido a la alta mortalidad durante las etapas embrionarias y larvarias (Palomino et al. 2017), debido en parte a la falta de información sobre la composición y fisiología del huevo. El huevo necesita todos los componentes bioquímicos esenciales para llevar a cabo el desarrollo de un embrión viable; estos los obtiene de los nutrientes transferidos por las hembras durante el crecimiento de los ovocitos dentro del ovario. Sin embargo, la calidad de los huevos y larvas de peces es variable. Aún se desconocen muchos de los factores que afectan la calidad de los huevos; pero en general, la calidad del desove (huevos) de los animales en cautiverio es generalmente menor que la de los organismos silvestres (Carnevali et al. 2001). En la industria de la acuicultura la "buena calidad del huevo" se ha definido como: huevos que muestran altas tasas de fertilización y eclosión, y baja mortalidad de las larvas hasta el destete (con alimentación artificial). Sin embargo, la producción exitosa de la etapa larval en peces podría predecirse a nivel molecular durante las primeras etapas de la embriogénesis mediante el uso de herramientas proteómicas, que permiten caracterizar la composición de las proteínas de los huevos, así como su función e interacción con otras proteínas involucradas en la embriogénesis. Muy pocos estudios están disponibles sobre la proteómica y el desarrollo embrionario del género *Seriola* spp (Pousis et al., 2018).

### Objetivos

Caracterizar los huevos fertilizados del jurel *Seriola rivoliana* en cautiverio, con la finalidad de identificar proteínas expresadas durante el proceso embrionario, así como su función. Esta investigación científica fue publicada recientemente en Serrano-Pinto y col. (2020).

### Materiales y Métodos

Los reproductores fueron capturados en Cabo San Lucas, B.C.S. México. Se mantuvieron con fotoperiodo natural y temperatura de 25 °C en tanques de 40 m<sup>3</sup> con sistemas de recirculación y

aireación suplementaria durante dos años, hasta que volvieron a madurar en cautiverio en las instalaciones de Kampachi Farms-CIBNOR en La Paz, BCS, México. Las hembras maduras fueron estimuladas por los machos para el desove (expulsión de los ovocitos hidratados); los huevos fertilizados se colectaron por gravedad en un colector de 500 L con una malla de retención de 500  $\mu$ m y se conservaron a -80 °C hasta su análisis. El análisis proteómico, se realizó de acuerdo a la metodología modificada de Serrano-Pinto y col. (2010) que incluyó la técnica de enfoque isoeléctrico (que separa las proteínas con base en su punto isoeléctrico) y el corrimiento bidimensional (2-DE) para revelar las proteínas más abundantes y en un rango de pH específico (3–10), en un sistema vertical de electroforesis con geles de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE), a 120 V durante ocho horas (para separar las proteínas en función de su peso molecular). Los geles se tiñeron con Coomassie azul brillante G-250 I-1, se escanearon y analizaron mediante el programa Image Master 2D Platinum v7.0 para detectar la cantidad de puntos o spots representando a cada proteína. Los puntos seleccionados con base en su mayor expresión de volumen, fueron analizados mediante espectrometría de masas MALDI / TOF TOF para la obtención de las secuencias peptídicas. Para la identificación de las proteínas se utilizó la base de datos Swiss-Prot y una base de datos con Metazoa como taxonomía seleccionada y una base de datos descargada de NCBI usando *Seriola* como género seleccionado (NCBI, 2017).

### Resultados y Discusión

Este estudio presenta la primera evaluación proteómica realizada en la especie *S. rivoliana*. En la figura 1 se muestra el gel 2-DE, representativo del total de las proteínas expresadas en los huevos, así como los puntos de proteínas seleccionados para el análisis de espectrometría de masas. La tabla 1 muestra las características de los puntos analizados. Estos puntos se identificaron como fragmentos de secuencias de cuatro vitelogeninas (Vtg): A, B, C y Ab. También se identificaron seis proteínas más:  $\beta$ -actina, peroxiredoxina, superóxido dismutasa 1 (SOD1), subunidad alfa del proteosoma, queratina I y

No. SPOT (pH) PROTEÍNA (MASA, Da)	PEPTIDOS	FUNCION MOLECULAR
3-4 (5.6-5.7)-Superóxido dismutasa 1- (15818.94)	HVVDLGNVTADKNGVAK	Actividad enzimática de defensa
1-2-4 (5.7-5.8)-Vitelogenina C-(123015.9)	IKFPEYTVYR	Desarrollo embrionario
5 (5.7-5.8)-Peroxiredoxina-(21576.08)	DYGVLEKEDGIAYR	Actividad enzimática de defensa
6 (5.9-6.0)-Vitelogenina Ab-(131192.3)	FFGQELAFANIDK	Desarrollo embrionario
7 (5.4-5.5)-Proteosoma subunidad alfa tipo 1- (29566.87)	NQYDNDVTVWSPQQR	Actividad enzimática de defensa
10 (5.6-5.65)-Vitelogenina A, parcial-(81380.24)	AFIDQAIALATAPSVQAFGR	Desarrollo embrionario
13 (5.9-6.0)-Beta actina, parcial-(41449.68)	DSYVVGDEAQSQR	Estructura celular y citoesqueleto
18 (4.5-4.6)-Vitelogenina B, parcial-(118923.74)	VQGYQLAAAYFDK	Desarrollo embrionario
20 (5.1-5.2)-Queratina, tipo I y II-(65999)	QSYGSGSSYSGGSGGSGGGGGGSGSGSSSSG	Estructura celular y citoesqueleto

queratina II. De acuerdo con su función, las proteínas identificadas están relacionadas con el desarrollo embrionario, la actividad enzimática-proteólisis, la actividad enzimática de defensa, el citoesqueleto y la estructura celular. Cinco de ellas se expresaron como puntos múltiples (en diferentes lugares en el mapa 2-DE), consideradas como isoformas de la misma proteína, comprobado por sus secuencias peptídicas (ver Tabla 1).

Estas isoformas pueden ser el resultado de modificaciones postraduccionales, como la fosforilación o la glucosilación. Ejemplos de estas proteínas son Vtg B, C, Ab, SOD1 y  $\beta$ -actina. En los organismos marinos, durante la ovogénesis y la embriogénesis, los procesos de síntesis y degradación de la Vtg (el precursor de la vitelina (glucopolifosfoproteína) que da origen a la yema de los huevos en los organismos ovíparos), son importantes ya que proporcionan nutrientes esenciales como aminoácidos, lípidos, carbohidratos, fosfatos e iones metálicos al embrión (Fagotto 1995). Otra proteína identificada fue la enzima  $\beta$ -actina. Los estudios en el embrión de Danio rerio (Ziv et al. 2008) indicaron que el gen de la  $\beta$ -actina desempeña un papel central en la estructuración del citoesqueleto celular. Otra proteína (identificada y representada por dos manchas en el gel), fue la enzima antioxidante SOD1, siendo el primer estudio en identificarla en huevos fertilizados en este grupo de peces. Las enzimas SOD y catalasa (CAT) expresadas en ovocitos y embriones de *Brycon amazonicus*, aumentaron durante el desarrollo embrionario y se consideró la primera línea de defensa contra las especies reactivas de oxígeno (ROS). La presencia de estrés oxidativo en los huevos o en sus progenitores en cautiverio pudiera ser causado por situaciones de anemia o infecciones oportunistas (Valderrama-Díaz 2014). De igual manera, la peroxiredoxina, identificada en este estudio, está asociada con el estrés oxidativo. Los ROS se forman durante la reducción del dioxígeno (O<sub>2</sub>) en el agua y éstos pueden dañar a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, por lo que se requieren sistemas antioxidantes eficientes que incluyen a las catalasas, peroxidasas y peroxiredoxinas capaces de degradar el dañino peróxido de hidrógeno (Yoshino et al. 2016). Otra proteína expresada fue la subunidad del proteosoma alfa tipo 1, que componen la maquinaria del proteosoma.

Las células eucariotas han desarrollado dos mecanismos para realizar muchos de los eventos proteolíticos controlados, maquinaria de ubiquitinación y proteosoma. La acción colaborativa de estas dos máquinas es crucial para una variedad de procesos que incluyen la progresión del ciclo celular, el desarrollo, la apoptosis, la transducción de señales, la presentación de antígenos y la regulación de la expresión génica (Baumeister et al., 1998) en respuesta a situaciones de estrés celular, como infecciones, cambios repentinos de temperatura o daño oxidativo.

### Conclusiones

La caracterización proteómica de los huevos de *S. rivoliana* realizada en este estudio, permitió conocer proteínas esenciales requeridas en la formación de un embrión, y permitió identificar proteínas antioxidantes asociadas con el estrés oxidativo en los organismos en cultivo en las instalaciones de Kampachi Farms-CIBNOR.

### Impacto Socioeconómico

Con base en la dificultad de mantener la etapa larvaria en condiciones de cautiverio en las granjas nacionales, esta caracterización proteómica servirá como referencia para futuros cultivos, tratando de evitar en lo sucesivo el estrés oxidativo en las larvas y huevos. La expresión de estas proteínas antioxidantes podría representar biomarcadores tempranos de calidad de huevos y larvas en esta especie y en el género *Seriola* spp. Estos marcadores pueden ser extremadamente importantes para no malgastar esfuerzos produciendo larvas de baja calidad en los criaderos, teniendo que obtener del medio natural afectando a las comunidades silvestres.



Contacto PCTI:  
[hnlasco2008@hotmail.com](mailto:hnlasco2008@hotmail.com)