



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**Caracterización morfológica, bioquímica y molecular
de la vitelogénesis de las hembras del crustáceo
subantártico centolla (*Lithodes santolla*)**

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biotecnología)

P r e s e n t a

Santos René Serrano Silvas

La Paz, Baja California Sur, Agosto de 2016.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 16: 08 horas del día 14 del Mes de AGOSTO del 2016, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

“Caracterización morfológica, bioquímica y molecular de la vitelogénesis de las hembras del crustáceo centolla (*Lithodes santolla*).”

Presentada por el alumno:

Santos René Serrano Silvas

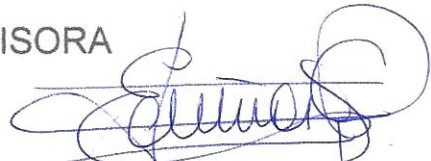
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Biotecnología**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA



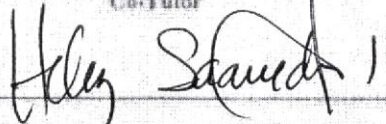
Dra. Guadalupe Fabiola Arcoz Ortega
Director de Tesis



Dra. Ellana Paola Acuña Gómez
Co-Tutor



Dra. Leydi del Rocío Canche Montes
Co-Tutor



Dra. Norma Yolanda Hernández Seavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos

COMITE TUTORIAL

Directora:

Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega
CIBNOR, La Paz, B. C. S.

Co-tutor:

Dra. Eliana Paola Acuña Gómez
CEQUA, Punta Arenas, Chile.

Co-tutor:

Dra. Leydi del Rocío Canche Moo
CEQUA, Punta Arenas, Chile.

Comité revisor de tesis:

Dra. Guadalupe Fabiola arcos Ortega
Dra. Eliana Paola Acuña Gomez
Dra. Leydi del Rocío Canche Moo

Jurado de examen de grado:

Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega
Dra. Eliana Paola Acuña Gómez
Dra. Leydi del Rocío Canche Moo

Suplente:

Dr. Claudio Humberto Mejía Ruíz

RESUMEN

La centolla (*Lithodes santolla*, Molina 1782), es un crustáceo decápodo que habita en aguas sub-antárticas y se distribuye desde Chiloé hasta Tierra del Fuego en aguas del Océano Pacífico y desde el estrecho de Magallanes hasta aguas profundas frente las costas de Uruguay en el Océano Atlántico, con grandes concentraciones de individuos en el Estrecho de Magallanes, el canal de Beagle y por debajo del paralelo 50° S. Debido a su abundancia en la región de Magallanes y Antártica chilena, la centolla ha constituido una importante pesquería mixta desde 1930 y es uno de los crustáceos con mayor importancia económica en esta región. Sin embargo, a pesar de su importancia como recurso pesquero, se conoce muy poco sobre sus procesos reproductivos especialmente desde una perspectiva molecular. Dado su relevancia, en este estudio se caracterizó la ovogénesis y vitelogénesis de *Lithodes santolla* mediante el uso de indicadores histológicos e histoquímicos (diámetro de los ovocitos, porcentaje de triglicéridos y porcentaje de fosfolípidos), la composición bioquímica (proteínas totales, lípidos totales, triglicéridos, carbohidratos totales y glucosa) de gónada, hepatopáncreas y hemolinfa y análisis moleculares (RT-qPCR). Los resultados obtenidos mediante tinción con hematoxilina-eosina, medición del tamaño de los ovocitos y observación de su morfología mediante microscopía de campo claro demuestran que el proceso de ovogénesis de *L. santolla* está caracterizado por ovogonias y 9 tipos diferentes de ovocitos (núcleolo cromatina, perinúcleolo temprano, perinúcleolo tardío, glóbulo lipídico, glóbulo de vitelo temprano, glóbulo de vitelo tardío, postvitelogénico, migración de la vesícula germinal y rompimiento de la vesícula germinal) y que estos se pueden clasificar en 5 estadios de desarrollo gonádico (proliferación, previtelogénesis, vitelogénesis, madurez y desove); adicionalmente, se observaron e identificaron ovocitos atrésicos. Los análisis bioquímicos mostraron que las concentraciones de proteínas totales, lípidos totales y triglicéridos en gónada aumentaron conforme progresaba el desarrollo

gonadal y se observó una correlación positiva y significativa entre el contenido de proteínas, lípidos y triglicéridos en el ovario y el diámetro de los ovocitos. El incremento en el contenido de lípidos en el ovario ocurre como resultado del proceso de maduración gonadal, sin embargo, no se observó un decremento en la concentración de lípidos en el hepatopáncreas como resultado de una movilización de reservas, lo que sugiere que los requerimientos lipídicos del ovario durante el desarrollo gonadal dependen en mayor medida de la ingesta dietaria que de los lípidos almacenados en el hepatopáncreas. No obstante, se observó un decremento en el contenido de proteínas en el hepatopáncreas junto con un respectivo aumento en hemolinfa en las etapas tardías del desarrollo gonadal, sugiriendo que las proteínas son movilizadas al ovario en esta fase. Por otro lado, se observó una correlación positiva y altamente significativa entre la concentración de triglicéridos en hemolinfa y el diámetro de los ovocitos por lo que esta correlación podría ser utilizada como un indicador bioquímico del grado de madurez ovárica de una hembra. Finalmente las secuencias obtenidas de la caracterización molecular mostraron similitud con secuencias de Ferritina, proteína asociada a la proliferación (PA2G4) y CDP-diacilglicerol pirofosfatasa entre otras.

Palabras clave: *Lithodes santolla*, ovogénesis, vitelogénesis, desarrollo gonadal, composición bioquímica.

Vo. Bo.

Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega

ABSTRACT

The southern king crab, *Lithodes santolla* (Molina 1782), is a decapod crustacean found in Antarctic waters and is distributed from Chiloe (South Pacific) to Tierra del Fuego, and from the Magellan Strait to Uruguay (South Atlantic), but has been particularly abundant in Strait of Magellan, the Beagle Channel, and south to 50° S. Because of their abundance in Magellan and Chilean Antarctic región, *L. santolla* had constituted a mixed fishery since the 1930s, and is one of the crustaceans with the highest commercial importance along these coasts. Despite their relevance, little is known about the reproductive processes especially from a molecular perspective. Given its relevance, in this study the oogenesis and vitellogenesis of *Lithodes santolla* was characterized using histological and histochemical indicators (oocyte diameter, triacylglycerides and phospholipides), biochemical composition (total protein, lipid and carbohydrate) of gonad, hepatopancreas (HP) and hemolymph and molecular analyses (RT-qPCR). Based on light microscopic observations of cells' sizes, morphology, and staining with Hematoxylin-Eosin, the female germ cells of *Lithodes santolla* could be classified into oogonias and nine different types of oocytes, which include chromatin nucleolus oocytes, early perinucleolus oocytes, late perinucleolus oocytes, oil globule oocytes, early yolk granulate oocytes, late yolk granulate oocytes, postvitellogenic oocytes, germinal vesicle migration oocytes (GVM) and germinal vesicle breakdown (GVB) oocytes. Additionally atretic oocytes were found in some gonads but their diameter was not determined. The whole oogenesis cycle of *Lithodes santolla* was divided into five stages based on the amount and types of oocytes present in each stage. Stage 0 and I are proliferation and previtellogenic stages, stage II are vitellogenesis stage, stage III and IV are maturity and spawned stages. The presence of oogonia and previtellogenic oocytes among fully mature oocytes in stage 3 could reflect the capacity of the ovary of *L. santolla* females to start a new full maturity cycle in a short time period after spawned. The biochemical analyses showed that the

proteins, lipids and triglycerides content in gonad increased in relation to gonadal development and a positive and significant correlation was observed between concentration of lipids, triglycerides and proteins in ovary and oocyte diameter. The increase of lipid levels in the ovary occurred as a result of the maturation process, but no concomitant decrease was registered in HP lipids. Under these circumstances, the lipid requirements of the developing ovary in *Lithodes santolla* seem to be more dependent on the ingestion of dietary lipids than on HP reserves. However, a decrease in protein levels was observed in HP towards the later stages of oogenesis together with an increment of protein content in hemolymph, suggesting that proteins are mobilized to ovary. On the other hand a significant and positive correlation was observed between triglycerides content in hemolymph and oocyte diameter and this correlation can be used as biochemical indicator of gonadal maturity. Finally, the sequences obtained from the molecular characterization showed similarity to sequences like Ferritin, proliferation-associated protein 2GA (PA2G4) and CDP-diacylglycerol pyrophosphatase.

Keywords: *Lithodes santolla*, oogenesis, vitellogenesis, gonad development, biochemical composition.

Vo. Bo.

Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega

DEDICATORIA

A mis padres, porque todos mis logros también son sus logros...

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada no. 301904 para la realización de mis estudios de maestría.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste por recibirme en sus instalaciones, especialmente a su personal administrativo, docente y técnico, por todo el apoyo brindado durante el curso de mis estudios.

Al Centro Científico Regional Fundación CEQUA, con un enorme y especial agradecimiento a su directora, la Dra. Eliana Paola Acuña Gómez por todo el apoyo brindado durante el desarrollo de mi tesis y por su gran hospitalidad durante mi estancia en este centro científico.

A los proyectos que financiaron el desarrollo de este trabajo: “Estudio combinado de variabilidad genética y morfológica de la centolla (*Lithodes santolla*) en la Región de Magallanes y Antártica Chilena: Herramientas para el manejo, sustentabilidad y plusvalía comercial del recurso” código 12BPC2-13541 y “Desarrollo, transferencia y aplicación de las tecnologías genómicas al desarrollo sustentable del recurso centolla de la Región de Magallanes y Antártica Chilena”. Fondo de innovación para la competitividad FIC-2012 CODIGO BIP: 30127734.

A mi familia, porque sin su ayuda nada de esto sería posible, por apoyar mis decisiones y por ayudarme siempre a salir adelante.

Un agradecimiento muy especial y lleno de cariño a la Dra. Gpe. Fabiola Arcos Ortega por aceptarme como su estudiante, por todo el apoyo brindado durante estos tres años y su constante esfuerzo y dedicación hacia el correcto desarrollo de este trabajo a pesar de las circunstancias y principalmente por toda la paciencia que me tuvo, mil gracias!

Agradezco la participación de la Dra. Leydi del Rocío Canche Moo como miembro de mi comité tutorial y su apoyo para el eficiente avance y culminación de esta tesis.

A la Dra. Carmen Rodríguez, por su importante y eficiente apoyo y colaboración durante el desarrollo de la parte histológica de este trabajo, de igual forma, agradezco la ayuda prestada por la técnico Eulalia Meza.

Al Dr. Martín Ramírez y al técnico Roberto Hernández por las facilidades y el apoyo prestado en sus laboratorios para el desarrollo de mi trabajo, así mismo, agradezco también a Edwin Velázquez y a la Dra. Rosa María Morelos por su ayuda y consejos durante el desarrollo de la parte molecular de este trabajo.

Quisiera también agradecer al personal de CEQUA por la ayuda prestada durante mi estancia. Además agradecer a Diana, Karla y Marcos por su hospitalidad, amistad y compañerismo, así como al L.D.G. Gabriel Quilahuilque Márquez por el apoyo en el diseño y edición de algunas fotografías.

Agradezco a Martha Barrera por ser mi compañera de batallas durante estos 3 años y por ofrecerme su amistad y apoyo incondicional.

Me gustaría agradecer enormemente a Cass todo su apoyo, cariño, ánimo y motivación para que pudiera concluir este trabajo. Gracias por ayudarme a hacer esto posible.

Por último, pero no menos importante, agradezco la hermosa compañía de mi guapo cachetón. Ya que su compañía y amor bastaban para alegrar esos días difíciles.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	i
ABSTRACT	iii
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABLAS	xv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Biología y fisiología reproductiva de crustáceos decápodos.	4
2.1.1. Características reproductivas de los decápodos.	4
2.1.2. Ovogénesis y vitelogénesis en decápodos.	6
2.1.3. Movilización de reservas energéticas durante la ovogénesis y vitelogénesis en hembras de decápodos.	9
2.1.4. Control endócrino de la vitelogénesis en hembras de decápodos.	12
2.1.5. Caracterización molecular de la vitelogénesis en hembras de decápodos.	14
2.2. Biología y fisiología reproductiva de <i>L. santolla</i>	17
2.2.1. Distribución.	17
2.2.2. Características morfométricas.	17
2.2.3. Ciclo de vida.	18
2.2.4. Dimorfismo sexual.	20
2.2.5. Ovogénesis, vitelogénesis y movilización de reservas en <i>L. santolla</i>	21

2.3. Importancia de <i>L. santolla</i> como recurso pesquero.	22
2.3.1. Medidas de administración pesquera de la centolla.	24
2.3.2. Retos actuales de la pesquería de la centolla en la región XII.	25
2.4. Biotecnologías para el estudio de la biología y fisiología reproductiva de la centolla.	26
2.4.1. Herramientas histológicas, histoquímicas y bioquímicas.	27
2.4.2. Herramientas moleculares (genómicas y transcriptómicas)	29
3. JUSTIFICACIÓN	31
4. HIPÓTESIS	32
5. OBJETIVOS	32
5.1. Objetivo general	32
5.2. Objetivos específicos.....	32
6. MATERIALES Y MÉTODOS	33
6.1. Origen y obtención de los organismos.....	33
6.2. Disección y toma de muestras.....	33
6.3. Caracterización morfohistológica e histoquímica de la vitelogénesis.	34
6.3.1. Preparación de las muestras para los análisis histológicos.	34
6.3.2. Caracterización morfológica del desarrollo gonadal.	35
6.3.3. Caracterización histoquímica de la vitelogénesis.....	37
6.3.3.1. Histoquímica de lípidos.....	38
6.3.3.2. Cálculo del índice de lípidos.	38

6.4. Análisis de la movilización de reservas energéticas durante la vitelogénesis.	39
6.4.1. Manejo de muestras y obtención de extractos de trabajo.....	39
6.4.1.1. Hemolinfa.....	39
6.4.1.2. Tejidos.....	39
6.4.2. Determinación de proteínas totales.....	40
6.4.3. Determinación de carbohidratos totales.....	42
6.4.4. Determinación de lípidos totales.....	43
6.4.5. Determinación de triglicéridos.....	45
6.4.6. Determinación de glucosa en hemolinfa.....	47
6.4.7. Análisis estadísticos.....	48
6.5. Metodología para la caracterización molecular de la vitelogénesis.....	49
6.5.1. Aislamiento del transcrito de vitelina de gónada y hepatopáncreas.	49
6.5.1.1. Diseño de cebadores para la amplificación del transcrito de vitelina.	49
6.5.1.2. Extracción de ARN total y síntesis de ADNc para la amplificación parcial del transcrito de vitelina.....	51
6.5.1.3. Obtención de los transcritos.....	52
6.5.1.4. Clonación y secuenciación de los transcritos obtenidos.....	53
7. RESULTADOS	54
7.1. Caracterización morfohistológica e histoquímica de la ovogénesis y vitelogénesis de hembras del crustáceo subantártico centolla (<i>L. santolla</i>).	54
7.1.1. Caracterización morfohistológica.....	54

7.1.2. Caracterización histoquímica.....	60
7.2. Movilización de las reservas energéticas durante la vitelogénesis de hembras de centolla (<i>L. santolla</i>).....	63
7.3. Caracterización molecular de la vitelogénesis de hembras del crustáceo subantártico centolla (<i>L. santolla</i>).....	71
7.3.1. Aislamiento del transcrito de vitelina de gónada y hepatopáncreas.	71
8. DISCUSIÓN	75
8.1. Caracterización morfohistológica e histoquímica de la ovogénesis y vitelogénesis de hembras del crustáceo subantártico centolla (<i>L. santolla</i>).	75
8.2. Movilización de las reservas energéticas durante la vitelogénesis de hembras del crustáceo subantártico centolla (<i>L. santolla</i>).....	84
8.2.1. Proteínas totales.	84
8.2.2. Lípidos totales y triglicéridos.	85
8.2.3. Carbohidratos totales y glucosa.	87
8.2.4. Correlaciones entre variables morfológicas y bioquímicas como indicadores de madurez gonadal.	88
8.3. Caracterización molecular de la vitelogénesis de hembras del crustáceo subantártico centolla (<i>L. santolla</i>).....	91
9. CONCLUSIONES	94
10. RECOMENDACIONES	95
11. LITERATURA CITADA	96
12. ANEXOS	116

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ingreso y rendimiento anual por embarcación de la pesquería de centolla en la región de Magallanes y Antártica Chilena (Región XII).	1
Figura 2. Modelo propuesto para el mecanismo de síntesis y transporte de vitelogenina (modificado de Mommsen y Walsh, 1988; Osada <i>et al.</i> , 2003; Matsumoto <i>et al.</i> , 2003; Serrano-Pinto <i>et al.</i> , 2005).	9
Figura 3. Representación esquemática de los principales controles endócrinos y neuroendócrinos sobre la vitelogénesis y reproducción en decápodos. MOIH: Hormona inhibidora del órgano mandibular; MF: Metil farnesoato; GIH: Hormona inhibidora de la gónada; GSH: Hormona estimuladora de la gónada; VTG: vitelogenina. Adaptado y modificado de Nagaraju (2007).	14
Figura 4. Distribución geográfica (sombreado en naranja) de <i>L. santolla</i> en la Patagonia sudamericana.	18
Figura 5. Vista dorsal y ventral de macho (izquierda) y hembra (derecha) de centolla (fotos: Manuel Sánchez, CEQUA).....	19
Figura 6. Esquema del ciclo reproductivo de Centolla (fuente: Modificado de Boschi <i>et al.</i> , 1984; Campodónico, 1971 y McLaughlin <i>et al.</i> , 2004).	19
Figura 7. Desembarque de centolla (<i>L. santolla</i>) en toneladas entre los años 1953 a 2013. Fuente: Subsecretaría de Pesca y Acuicultura (2014).	23
Figura 8. Modelo esquemático de la circulación vertical en las tres zonas de los fiordos de australes: a) boca del Guafo a estuario Reloncaví; b) boca del Guafo a estero Elefantes; c) golfo de Penas a canal Concepción; d) estrecho de Magallanes (fuente: Sievers y Silva, 2006).	25
Figura 9. Toma de muestras de hemolinfa y tejidos.	35
Figura 10. Principio químico para determinación de proteínas totales por el método del ácido Bicinconínico (BCA).	41
Figura 11. Principio químico para la determinación de carbohidratos totales por el método de Antrona.	42
Figura 12. Principio químico para la determinación de lípidos totales por el método de sulfofosfovainillina.	44
Figura 13. Principio enzimático para la determinación de triglicéridos. GK: glicerol kinasa; GPO: glicerol fosfato oxidasa; POD: peroxidasa.	46
Figura 14. Principio enzimático de la determinación de glucosa. GOD: glucosa oxidasa; POD: peroxidasa.	48

Figura 15. Micrografía del desarrollo ovárico (ovogénesis) de las hembras de centolla (*L. santolla*). A) Ovario en Estadio 0 (Multiplicación) con ovogonias en multiplicación (Og); ovogonias en mitosis (Om); ovocitos en nucléolo cromatina (Cn). B, C, D) Ovario en Estadio I (Previtelogénesis) con ovocitos perinucleolo temprano (Pn1), y perinucleolo tardío (Pn2). E, F, G, H); Ovario en Estadio II (Vitelogénesis) con ovocitos en subestadio de vitelogenesis temprana (Ev) y glóbulo de aceite (Li) (fase primaria de vitelogénesis) y ovocitos en subestadio granulo de vitelo (yg), ovocitos en subestadio glóbulo de vitelo temprano (Vo1) (fase secundaria de vitelogénesis). I, J, K, L) Ovario en Estadio III (Madurez) con ovocitos postvitelogénicos (Pvo) y ovocitos con migración de vesicular germinal (Gvm). M, N, O, P) Ovario en Estadio IV (Desove) con ovocitos con rompimiento de vesicular germinal (Gvb), Ovulos (Ov) y ovocitos en atresia (Ao); fc = células foliculares; fl = folículo; Li= glóbulo de aceite; n = núcleo; nc = nucléolo; yg = gránulos de vitelo.....55

Figura 16. Micrografía con la caracterización histoquímica de lípidos del desarrollo ovárico (ovogénesis) de las hembras de centolla (*L. santolla*). A y B) Ovario en Estadio I (Previtelogénesis) con ovocitos en perinucleolo temprano (Pn1) y perinucleolo tardío (Pn2); C y D) Ovario en Estadio II (Vitelogénesis) con ovocitos en subestadio de glóbulo de aceite (Li) (fase primaria de vitelogénesis) y ovocitos en subestadio glóbulo de vitelo temprano (Vo1) (fase secundaria de vitelogénesis); E y F) Ovario en Estadio III (Madurez) con ovocitos postvitelogénicos (Pvo); G y H) Ovario en Estadio IV (Desove) ovocitos con migración de vesicular germinal (Gvm), óvulos (Ov); li = glóbulo de aceite; n = núcleo; nc = nucléolo; yg = gránulos de vitelo. Tinción Sudan Negro.....61

Figura 17. Concentración de proteínas totales durante los diferentes estadios de la ovogénesis de *L. santolla*.....66

Figura 18. Concentración de lípidos totales durante los diferentes estadios de la ovogénesis de *L. santolla*.....66

Figura 19. Concentración de triglicéridos durante los diferentes estadios de la ovogénesis de *L. santolla*.....67

Figura 20. Concentración de carbohidratos totales (tejidos) y glucosa (hemolinfa) durante los diferentes estadios de la ovogénesis de *L. santolla*.....68

Figura 21. Correlaciones entre la concentración de triglicéridos y el diámetro teórico de los ovocitos de *L. santolla* en cada uno de los tejidos analizados (Gónada, hepatopáncreas y hemolinfa respectivamente).71

Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de fragmentos amplificados. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen), del 2 al 5 amplificaciones con los primers Vtg9, el 6 la amplificación de primers Vtg8, el 7 la amplificación de primers Vtg5 y el 8 la amplificación de primers Vtg6 (anexo 1).73

Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de fragmentos amplificados con pares de primers combinados. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen), el 2 amplificaciones con Vtg6-F y Vtg4-R, el 3 y 4 la amplificación de Vtg4-F y Vtg4-R, el 5 la amplificación de Vtg4-F y Vtg5-R, el 6 la amplificación de Vtg5-F y Vtg4-R, el 7 y 8 la amplificación de Vtg5-F y Vtg6-R.....73

Figura 24. Comparación de las correlaciones entre el desarrollo gonadal y la concentración de proteínas en gónada y hepatopáncreas de *C. quadricarinatus* (A: gonada, B: hepatopáncreas) y *L. santolla* (C: gónada, D: hepatopáncreas).90

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Pesos moleculares de vitelinas de algunas especies de crustáceos decápodos.....	8
Tabla II. Tamaños del gen de vitelina de algunos decápodos.....	15
Tabla III. Secuencias utilizadas en el diseño de los cebadores.	49
Tabla IV. Cebadores inespecíficos diseñados para transcrito de vitelina.....	50
Tabla V. Clasificación de los estadios de desarrollo ovárico identificados en las hembras de centolla (<i>L. santolla</i>), con base en las clasificaciones establecidas para <i>Penaeus japonicus</i> (Yano, 1988), <i>Panulirus japonicus</i> (Minagawa y Sano, 1997) y <i>Maiopsis panamensis</i> (López-Martínez, Sometido).....	56
Tabla VI. Descripción morfo-histológica de los estadios de desarrollo ovárico identificados en las hembras adultas del crustáceo subantártico centolla (<i>L. santolla</i>).	57
Tabla VII. Análisis de varianza (ANOVA) de una vía realizado para las variables morfo-histológica cuantitativas obtenidas de los estadios de desarrollo ovárico identificados en las hembras de centolla (<i>L. santolla</i>). Se presentan los valores promedio \pm error estándar.	58
Tabla VIII. Análisis de varianza (ANOVA) de una vía realizado para las variables morfo-histológica obtenidas de los diferentes tipos de ovocitos pertenecientes a los estadios de desarrollo ovárico, identificados en las hembras de centolla (<i>L. santolla</i>). Se presentan los valores promedio \pm error estándar.....	59
Tabla IX. Análisis de varianza (ANOVA) de una vía realizado para las variables morfo-histológica e histoquímica cuantitativas obtenidas de los estadios de desarrollo ovárico identificados en las hembras de centolla (<i>L. santolla</i>). Se presentan los valores promedio \pm error estándar.....	62
Tabla X. Análisis de varianza (ANOVA) de una vía realizado para las variables histoquímicas obtenidas de los diferentes tipos de ovocitos pertenecientes a los estadios de desarrollo ovárico, identificados en las hembras centolla (<i>L. santolla</i>). Se presentan los valores promedio \pm error estándar.....	63
Tabla XI. Composición bioquímica de la hemolinfa, hepatopáncreas y ovario de hembras de centolla (<i>L. santolla</i>), durante los diferentes estadios de la vitelogénesis. Se presentan los valores promedio \pm error estándar.....	65
Tabla XII. Coeficientes de correlaciones de Pearson's (<i>r</i>) entre las variables morfológicas de hembras de centolla (<i>L. santolla</i>) y las variables bioquímicas de los tres tejidos analizados.....	69

Tabla XIII. Coeficientes de correlación de Pearson's (r) entre el diámetro de los ovocitos y las variables bioquímicas analizadas en ovario, hepatopáncreas y hemolinfa de las hembras de centolla (*L. santolla*).70

Tabla XIV. Comparación del diámetro de los diferentes tipos de ovocitos descritos del crustáceo subantártico *L. santolla* con el cangrejo *Ranina ranina* (Minagua *et al.*, 1993) el camarón *Penaeus japonicus* (Yano, 1988) y el cangrejo araña *Maiopsis panamensis* (López-Martínez, Sometido).83

1. INTRODUCCIÓN

La centolla (*Lithodes santolla*, Molina, 1782) es un crustáceo decápodo subantártico emblemático de la región de Magallanes y Antártica chilena (Región XII). Su pesquería se desarrolla al sur del paralelo 40°S desde 1930, siendo actualmente una de las principales pesquerías de esta región. Los rendimientos anuales oscilan alrededor de las 6400 toneladas anuales (Schvezov *et al.*, 2013), y debido a que el precio de exportación es superior al de otros recursos exportados, la centolla posee un gran valor económico, por lo que se considera como una de las actividades pesqueras más rentables en la región de Magallanes y Antártica chilena (Región XII) (Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, 2014) (Fig. 1).

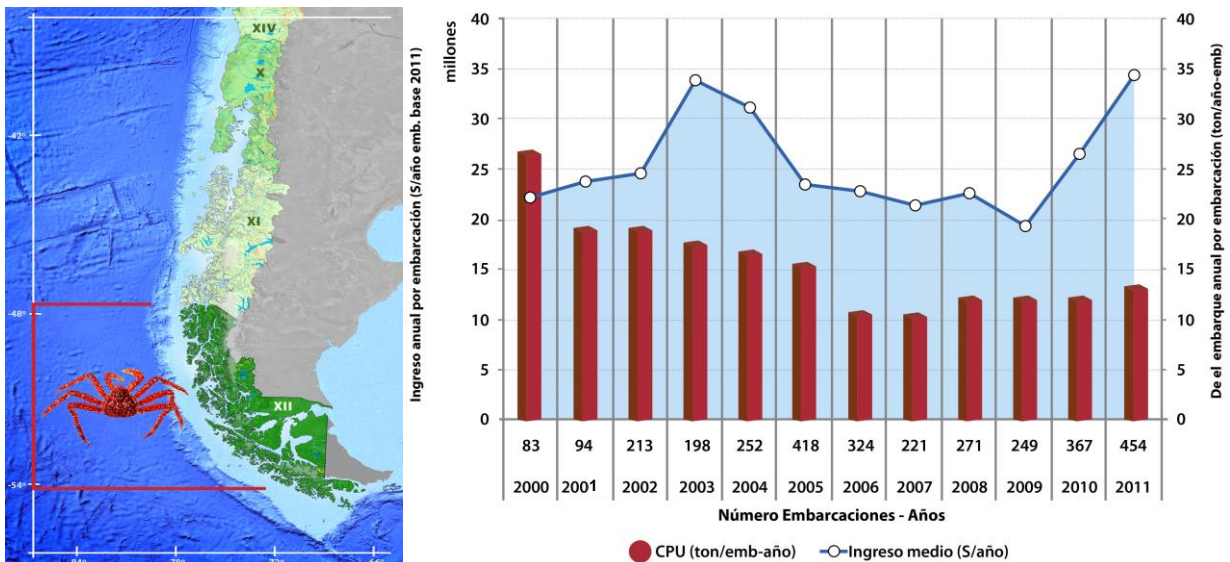


Figura 1. Ingreso y rendimiento anual por embarcación de la pesquería de centolla en la región de Magallanes y Antártica Chilena (Región XII) (fuente: Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, 2014).

Actualmente, dentro de las implementaciones de regulación se encuentra el tamaño mínimo de comercialización, el cual es de 120 mm de longitud de caparazón, la veda permanente de hembras del crustáceo y vedas temporales implementadas en zonas donde se observa un bajo rendimiento del recurso (Sernapesca, 1997).

A pesar de que la pesquería de la centolla es una de las actividades más rentables en la región de Magallanes y Antártica chilena, la información sobre los diversos procesos reproductivos, genéticos y genómicos de estos organismos es limitada o inexistente, lo que limita el establecimiento de estrategias de manejo y regulación sustentable del recurso basados en el conocimiento sobre su biología reproductiva y genética.

En cuanto a su biología reproductiva se conoce que la especie *Lithodes santolla* se reproduce anualmente entre los meses de noviembre a enero (Vinuesa, 1990); sin embargo, no existen estudios que determinen exactamente las fechas o periodos de reproducción en toda la Región de Magallanes y Antártica chilena. Se ha establecido de manera general que el proceso de reproducción de la especie es largo, aproximadamente 10 meses (Lovrich y Vinuesa, 1999) y el crecimiento de los individuos es lento tardando hasta 5 años en madurar sexualmente (Lovrich y Vinuesa, 1999; Vinuesa y Lombardo, 1982), características que hacen difícil el proceso de recuperación de la especie cuando es sobreexplotada.

Uno de los procesos fundamentales en el desarrollo reproductivo de las hembras de los crustáceos decápodos es la vitelogénesis, mediante el cual se sintetizan, se transportan y se almacenan diversas reservas bioquímicas principalmente proteínas denominadas vitelinas, las cuales constituyen la principal fuente de alimentación durante el desarrollo embrionario (Charniaux-Cotton, 1985). La síntesis de vitelinas está en función de la expresión del gen correspondiente, diversos estudios realizados en crustáceos decápodos indican que este gen se expresa en tejidos como el ovario y el hepatopáncreas (Charniaux-Cotton, 1985;

Ibarra *et al.*, 2007; Joen *et al.*, 2010; Tsukimura, 2001; Tsutsui *et al.*, 2000; Wilder *et al.*, 2010).

El estudio y la caracterización morfológica, bioquímica y molecular de la vitelogénesis, ha sido una herramienta útil para determinar la condición reproductiva de hembras (estadio de madurez y capacidad reproductiva) de crustáceos decápodos de importancia comercial (Chang *et al.*, 1993; Arcos *et al.*, 2003 a,b; Serrano-Pinto, 2005; Arcos *et al.*, 2009; Arcos *et al.*, 2011) y ha sido de gran utilidad para conocer los mecanismos que controlan el proceso reproductivo permitiendo el desarrollo de biotecnologías de cultivo (Ibarra *et al.*, 2007; Joen *et al.*, 2010; Tsukimura, 2001; Tsutsui *et al.*, 2000; Wilder *et al.*, 2010).

Por estos motivos en este estudio se planteó realizar la caracterización morfológica, bioquímica y molecular de la vitelogénesis de las hembras de centolla (*L. santolla*) con el fin de contribuir con conocimiento que pueda permitir una mayor comprensión del proceso reproductivo de esta especie y pueda ser de utilidad y ayuda en el establecimiento de estrategias de manejo sustentable y de biotecnologías de cultivo de esta especie.

2. ANTECEDENTES

2.1. Biología y fisiología reproductiva de crustáceos decápodos.

2.1.1. Características reproductivas de los decápodos.

Los crustáceos representan un extenso subfilo dentro de los Artrópodos compuesto por alrededor de 67,000 especies entre las cuales se encuentran los crustáceos decápodos que incluyen varios grupos de animales tales como langostas, camarones, langostinos y cangrejos. Es un grupo altamente diversificado en cuanto a tamaño corporal, forma de vida y hábitat, y se caracterizan por ser fundamentalmente seres acuáticos de aguas dulces, salobres o marinas, aunque también existen de vida terrestre como los isópodos (Brusca y Brusca, 2005). El cuerpo de los crustáceos es segmentado y organizado en tres regiones distintas: cabeza, tórax y abdomen. Sin embargo, en muchas especies la cabeza y el tórax se encuentran unidos formando el cefalotórax, el resto del cuerpo pertenece al abdomen incluyendo la cola si está presente. El abdomen se encuentra diversamente desarrollado a través del filo y es por lo general de tamaño muy reducido (Ruppert *et al.*, 2004).

Los crustáceos decápodos al igual que la mayoría de los artrópodos son de sexos separados, es decir, presentan un patrón sexual de tipo gonocórico, aunque también se encuentran casos de hermafroditismo y partenogénesis (Braga *et al.*, 2009). Dentro de las generalidades del proceso reproductivo de los decápodos se encuentran el desarrollo de mecanismos de cortejo, la cópula y la incubación de huevos (Barkii y Karplus, 1999).

El cortejo es un comportamiento que permite a los machos de muchas especies animales mejorar sus probabilidades de apareamiento. En las distintas especies de decápodos el cortejo puede diferir en cuanto a la duración, complejidad y sexo que lo inicia. El mecanismo de cortejo es un comportamiento iniciado por señales

químicas (feromonas) que son detectables por quimiorrecepción a distancia o bien por contacto táctil (Barkii y Karplus, 1999).

Durante la cópula el macho transfiere a la hembra unas estructuras denominadas espermatóforos que están constituidos por una mezcla de espermatozoides y secreciones de adherencia cuyo origen es el vaso deferente del aparato reproductor masculino. Esta estructura es adherida al abdomen de la hembra en una zona próxima a sus gonoporos a fin de facilitar la fecundación de los huevos. En muchos taxos el primer o primeros dos pares de pleópodos son más largos en los machos que en las hembras y constituyen apéndices modificados que actúan como estructuras copuladoras y para la transferencia del esperma (Hobbs *et al.*, 2007). En las hembras de algunas especies, el dimorfismo sexual se observa en el tamaño corporal y a nivel del pleon, el cual se modifica para la incubación de los huevos (Hobbs *et al.*, 2007).

La fertilización de las hembras puede ser interna o externa y ocurre al momento de la ovodepositación. En las especies con fecundación externa, existe una tendencia a una mayor complejidad del espermatóforo, asociada a la prolongada permanencia en el abdomen de la hembra (López Greco *et al.*, 2007), mientras que en especies de fecundación interna tiende a ser más simple (Bauer, 1996).

La mayor parte de los decápodos incuban sus huevos en alguna estructura especializada, como pueden ser cámaras incubadoras especiales o sacos ovígeros a ambos lados del abdomen (copépodos). La mayoría de los decápodos llevan sus huevos (y eventualmente también los juveniles tempranos) sujetos a apéndices abdominales modificados (Hickman *et al.*, 2009). El periodo de incubación de los huevos varía en los distintos grupos de decápodos, desde algunas semanas hasta diez meses, incluso con periodos de diapausa. La duración del período de incubación es dependiente de la temperatura, entre otros factores (Reynolds, 2002).

Se pueden reconocer dos tipos de desarrollo embrionario en decápodos, a saber, desarrollo directo e indirecto. Las especies que se caracterizan por tener un desarrollo directo son aquellas en las que, tras la eclosión del huevo, emerge un juvenil de aspecto idéntico a un adulto, pero de menor talla. Este patrón de desarrollo embrionario ocurre prácticamente en todos los decápodos de agua dulce. Sin embargo, en la mayoría de los decápodos el desarrollo es indirecto, emergiendo del huevo una forma larvaria, completamente distinta al adulto en apariencia y estructura. Dicha larva, deberá experimentar distintas etapas de metamorfosis hasta alcanzar el estadio juvenil, según el grupo de decápodo que se trate (Anger, 2006). En las especies con desarrollo indirecto, se observa una mayor inversión gamética, contrariamente a lo que ocurre en aquellos crustáceos con desarrollo directo, donde en cambio, el cuidado parental resulta más importante. En este último caso, la cantidad de huevos es considerablemente menor y de mayor tamaño con respecto a las especies que poseen desarrollo indirecto (Reynolds, 2002).

2.1.2. Ovogénesis y vitelogénesis en decápodos.

La ovogénesis es un proceso continuo y complejo, que para su descripción se divide principalmente en dos etapas, una etapa de proliferación de ovocitos (multiplicación) y una etapa de diferenciación y crecimiento del mismo que abarca desde la previtelogénesis y vitelogénesis hasta su maduración (Adiyodi y Subramaniam, 1983).

Durante la etapa proliferativa las células germinales localizadas en las paredes foliculares dan origen a ovogonias primarias las cuales son completamente rodeadas por células mesodérmicas, estas ovogonias proliferan mediante mitosis la cual se lleva a cabo exclusivamente en la zona germinal, generando ovogonias secundarias, continuamente las ovogonias secundarias se alejan de la zona germinal arrestadas en profase meiótica convirtiéndose así en ovocitos primarios (Charniaux-Cotton, 1985).

La etapa de crecimiento ovocitario puede subdividirse en dos fases principales: a) previtelogénica, caracterizada por la proliferación gonadal, en un ovario aún inmaduro y b) vitelogénica, que ocurre a su vez en otras dos fases: vitelogénesis primaria o endógena y secundaria o exógena (Charniaux-Cotton, 1985).

En la fase previtelogénica los ovocitos se encuentran detenidos en profase meiótica y comienzan a incrementar su diámetro, se sintetizan ribosomas a una tasa elevada en el citoplasma, comienza a desarrollarse el retículo endoplasmático rugoso y se acumula ARNm (mensajero de ácido ribonucleico) para la síntesis de proteínas del vitelo (Charniaux-Cotton, 1985).

Durante la fase vitelogénica se sintetiza, transporta y almacenan proteínas del huevo o vitelo denominadas vitelinas (Quackenbush, 1989; Tsukimura, 2001). Las vitelinas son proteínas complejas, de alto peso molecular y generalmente se encuentran asociadas a lípidos, glúcidos y carotenoides, por lo cual se clasifican como una lipoglicocarotenoproteína (Tsukimura, 2001). En los crustáceos decápodos el peso molecular de las vitelinas varía desde 283 kDa hasta los 800 kDa (Tabla I). Ambas proteínas son similares inmunológicamente y se diferencian únicamente a nivel de subunidades (Chang *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 1993; Tsukimura, 2001).

Algunos estudios sobre la vitelogenina de crustáceos decápodos indican que está compuesta por tres subunidades con pesos moleculares alrededor de los 200, 100 y 90 kDa respectivamente (Chang *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1997; Wilder *et al.*, 1994), en cuanto a la vitelina algunos autores reportan que en su forma nativa tiene un peso molecular de aproximadamente 440 kDa y está compuesta por dos subunidades de 100 y 90 kDa aproximadamente (García *et al.*, 2006).

Tabla I. Pesos moleculares de vitelinas de algunas especies de crustáceos decápodos.

Especie	Tamaño (kD)	Referencia
<i>Penaeus vannamei</i>	289	Tom <i>et al.</i> , 1992
<i>Metapenaeus ensis</i>	350	Qiu <i>et al.</i> , 1997
<i>Penaeus japonicus</i>	500	Vázquez-Boucard <i>et al.</i> , 1986
<i>Penaeus monodon</i>	540	Chang <i>et al.</i> , 1993
<i>Palaemon paucidens</i>	630	Nakagawa <i>et al.</i> , 1982
<i>Pandalus kessleri</i>	560	Quinitio <i>et al.</i> , 1989
<i>Potamon potamios</i>	551	Pateraki y Stratakis, 1997

El almacenamiento de vitelinas se da por parte del ovocito y es de fundamental importancia para su desarrollo, la síntesis de esta puede ser de forma endógena o exógena. En decápodos, la síntesis endógena de vitelina conocida como vitelogénesis primaria generalmente está relacionada a las primeras fases del desarrollo de los ovocitos y la síntesis exógena de vitelina conocida como vitelogenina secundaria se asocia a un desarrollo avanzado de los mismos, mediante la síntesis de su precursor la vitelogenina (Charniaux-Cotton, 1985; Tsukimura, 2001).

En la vitelogénesis primaria, los ovocitos comienzan a sintetizar vitelinas y a aumentar su diámetro debido a la acumulación de esta proteína. Durante esta etapa la formación de ovocitos por parte del ovario es continua (Charniaux-Cotton, 1985).

La vitelogénesis secundaria es caracterizada por un aumento significativo en el diámetro de los ovocitos, este aumento es provocado por la incorporación al ovocito de vitelogenina producida exógenamente, en muchos decápodos la vitelogenina exógena es producida en el hepatopáncreas y transportada a los ovarios vía hemolinfa donde es captada e introducida a los ovocitos mediante

endocitosis por medio de un receptor específico para vitelogenina presente en la membrana celular, posteriormente es disociada en lipovitelina y fosvitina (Fig. 2) (Charniaux-Cotton, 1985; Tsukimura, 2001).

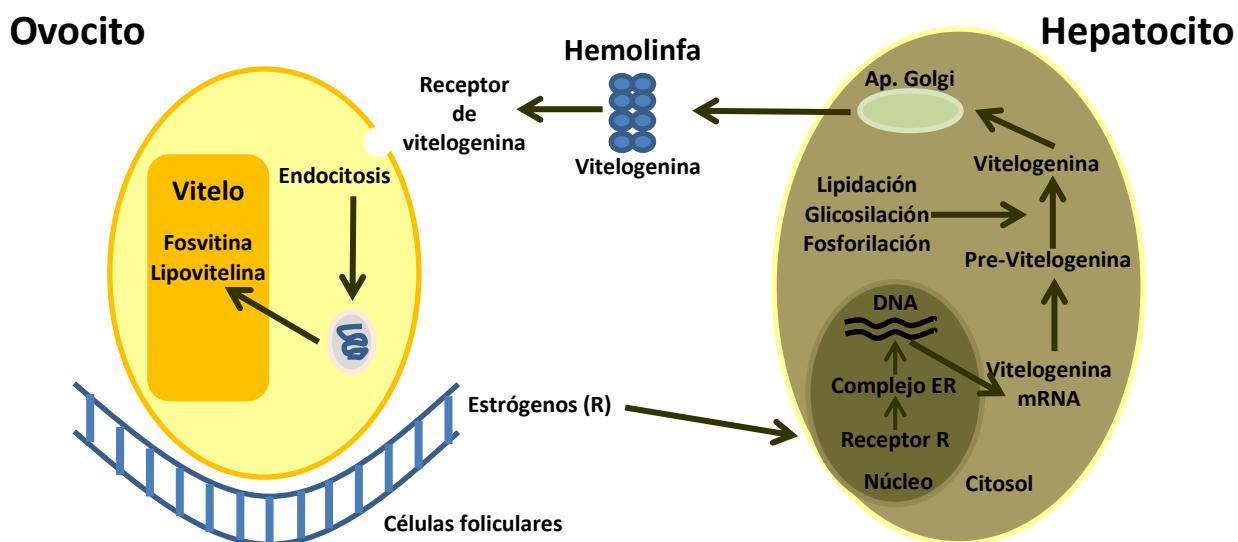


Figura 2. Modelo propuesto para el mecanismo de síntesis y transporte de vitelogenina (modificado de Mommsen y Walsh, 1988; Osada *et al.*, 2003; Matsumoto *et al.*, 2003; Serrano-Pinto *et al.*, 2005).

2.1.3. Movilización de reservas energéticas durante la ovogénesis y vitelogénesis en hembras de decápodos.

Durante los procesos de ovogénesis y vitelogénesis se genera una gran síntesis y acumulación de diversas moléculas bioquímicas en el ovario necesarias para sostener la formación y el desarrollo de los ovocitos. La mayoría de las veces los nutrientes obtenidos a través de la dieta no son suficientes para suplir esta demanda, lo que involucra la movilización de reservas energéticas tales como carbohidratos, proteínas y lípidos desde los tejidos de almacenamiento hacia la gónada (Reynolds, 2002; Harrison, 1990).

De las principales macromoléculas de reserva energética, los lípidos juegan un importante rol debido a que están asociados a la maduración de los ovocitos y la supervivencia de larvas en estadios iniciales (Sánchez-Paz *et al.*, 2006). Dentro de los lípidos, los triglicéridos constituyen la mayor fuente de reserva en huevos, larvas y adultos (Ward *et al.*, 1979; Clarke, 1982). Por otra parte los fosfolípidos tienen una importante función como constituyentes del citoplasma y membranas celulares y son también la mayor forma de lípidos transportados por la hemolinfa. Los esteroides son otro tipo de lípidos comúnmente encontrados en el ovario donde contribuyen a la formación de membranas y hormonas (Teshima y Kanazaga, 1978, 1979, 1980). Por estos motivos la variación de la composición lipídica a través del desarrollo gonadal en los diversos tejidos involucrados (gónada y hepatopáncreas) es uno de los cambios más estudiados y documentados en la literatura (Castille y Lawrence, 1989; Teshima *et al.*, 1989; Palacios *et al.*, 2000)

Durante la ovogénesis ocurre una gran acumulación de lípidos en el ovario, la mayor parte de esta acumulación se genera en las etapas tardías de la vitelogénesis (vitelogénesis secundaria) (Castille y Lawrence, 1989; Palacios *et al.*, 2000) representando hasta el 41% de la masa seca al final de la maduración de los ovocitos (Sánchez-Paz *et al.*, 2006). Esta acumulación es debido a que los lípidos proporcionan la energía necesaria para estos procesos biosintéticos, la cual es tomada y acumulada por los ovocitos para posteriormente sostener el desarrollo normal de los embriones y el proceso pre-alimentación de larvas (Harrison, 1990; Racotta *et al.*, 2003).

En las hembras de decápodos el hepatopáncreas funciona como el mayor órgano de almacenamiento y procesamiento de reservas energéticas, principalmente lípidos (Vogt *et al.*, 1985). En diversos estudios se ha demostrado la movilización de lípidos desde el hepatopáncreas hacia el ovario durante la ovogénesis principalmente en sus etapas tardías (Castille y Lawrence, 1989; Teshima *et al.*, 1989), sin embargo, la cantidad de lípidos acumulada en el ovario es mucho mayor que la almacenada en el hepatopáncreas por lo que en otros estudios se

ha atribuido además a la síntesis de *novo* en el ovario o a la alimentación (Harrison, 1990).

Por otra parte las proteínas presentan un patrón acumulativo similar al de los lípidos durante la ovogénesis, en *Parapenaeopsis hardwickii* se observó que el contenido de proteínas disminuía en el hepatopáncreas con su incremento en el ovario (Kulkarni y Nagabhushanam, 1979). Otro estudio en *Uca tangeri* reporto un incremento significativo en el contenido de proteínas y lípidos en el ovario en las fases tardías de la ovogénesis a expensas de carbohidratos, lo que sugiere la movilización de los mismos desde otro tejido (Mourente *et al.*, 1994).

Los carbohidratos son almacenados en el musculo y hepatopáncreas como glucógeno y son movilizados para servir como precursores de intermediarios metabólicos y fuente de energía. Su papel en la ovogénesis es aún incierto, sin embargo su utilización en la producción de ácidos nucleicos y como un componente de los pigmentos del ovario remarcan su importancia en los procesos de ovogénesis y vitelogénesis (Harrison, 1990).

Por ultimo la hemolinfa funciona como la vía de transporte de las reservas desde los tejidos de almacenamiento hacia el ovario, también transporta los nutrientes obtenidos mediante la dieta, por lo cual los cambios en su composición bioquímica podrían evidenciar la movilización de las reservas de un tejido a otro (Palacios *et al.*, 2000). En decápodos Uno de los componentes analizados durante el proceso de maduración gonadal en hemolinfa ha sido la vitelogenina, encontrando una mayor concentración en las etapas tardías de maduración (Arcos *et al.*, 2003a).

En decápodos la acumulación y movilización de las reservas bioquímicas en y entre los diferentes tejidos involucrados en el proceso de maduración gonadal pueden ser un indicativo del potencial reproductivo de una hembra, por ejemplo se han encontrado hembras que acumularon mayor cantidad de lípidos y proteínas presentando la capacidad de madurar varias veces, por lo que se ha sugerido

relacionar indicadores bioquímicos con la capacidad de múltiples desoves (Palacios *et al.*, 2000; Arcos *et al.*, 2003b; Palacios y Racotta, 2003).

2.1.4. Control endócrino de la vitelogénesis en hembras de decápodos.

La reproducción y la muda son procesos fisiológicos asociados y coordinados antagónicamente debido a que demandan una gran cantidad de energía por parte del organismo, por lo que es necesaria una precisa coordinación endocrina para ambos (Reynolds, 2002). El control neuroendocrino de la vitelogénesis en hembras de decápodos fue demostrado por primera vez mediante experimentos de corte del pedúnculo ocular, los cuales mostraron la estimulación del crecimiento ovárico y una ovodepositación prematura (Panouse, 1943). Muchos estudios realizados en la regulación endocrina de la reproducción y muda de hembras, han revelado que ambos procesos son controlados por una compleja interacción de una gran cantidad de neuropéptidos y esteroides (Chang, 1997).

Dentro de los órganos endócrinos y neuroendócrinos presentes en decápodos, encontramos el complejo órgano X-glándula sinusal (XO-SG), el órgano postcomisural, el órgano pericárdico, el órgano mandibular, el órgano Y, el ganglio torácico, la glándula androgénica y el ovario (Vogt, 2002).

El complejo formado por el órgano X y la glándula sinusal, ubicados ambos en los pedúnculos oculares, es el principal centro de control endocrino de decápodos (Fingerman, 1995). Este complejo juega un rol integrador de gran importancia en la regulación de la reproducción, la muda, la pigmentación y los ritmos circadianos entre otros procesos. Este complejo es el principal sitio de síntesis, almacenamiento y secreción de neurohormonas peptídicas tales como la hormona hiperglucemiante (CHH), la hormona inhibidora de la muda (MIH), la hormona inhibidora gonadal o inhibidora de la vitelogénesis (GIH ó VIH) y la hormona inhibidora del órgano mandibular (MOIH) (Vogt, 2002). A su vez, estas neurohormonas regulan la actividad de órganos endócrinos tales como el órgano Y, el órgano mandibular y el ovario (Fingerman, 1995) (Fig. 3). Por otra parte el

órgano mandibular y el ovario producen compuestos de tipo esteroideos que estimulan el proceso de la reproducción (Nagaraju, 2011; Fingerman, 1997), así mismo el ganglio torácico realiza la producción de la hormona estimuladora gonadal (GSH) que induce el crecimiento gonadal y el desarrollo de la vitelogénesis secundaria mediante la incorporación de vitelogenina al ovocito (Nagaraju, 2011) (Fig. 3).

Carlisle y Knowles (1959) concluyeron que el principal inhibidor del crecimiento del ovario se encontraba en el complejo XO-SG y estaba ausente en el resto del pedúnculo ocular, la remoción de solo el complejo XO-SG aceleraba los procesos reproductivos, tales como la maduración de los ovarios y como la vitelogénesis. Otros estudios posteriores revelaron que la hormona GIH era la responsable de restringir la vitelogénesis secundaria fuera de los periodos de reproducción (Charniaux- Cotton, 1985; Paulus y Laufer, 1987; Nagaraju, 2011).

El efecto inhibidor de la hormona GIH en la reproducción de los decápodos está relacionado a la maduración gonadal y también tiene un efecto inhibidor sobre la síntesis de vitelogenina en sitios extraovaricos, Paulus y Laufer (1987) sugieren que los tejidos blanco de esta hormona serían los ovarios y el hepatopáncreas, lo cual estaría indicando que la GIH inhibiría específicamente la captación de vitelogenina por parte de los ovocitos y/o la síntesis de las proteínas del vitelo, tanto en el ovario como en el hepatopáncreas (Charniaux- Cotton, 1985).

Nagaraju (2011) propone dos vías fisiológicas por las cuales se explicaría la inhibición de la captación de vitelogenina causada por la GIH. Una de ellas es que la GIH se uniría a la vitelogenina previniendo la unión al receptor. La otra vía indica que la GIH se uniría al receptor de manera tal de bloquear el sitio de unión de la vitelogenina (Nagaraju, 2011).

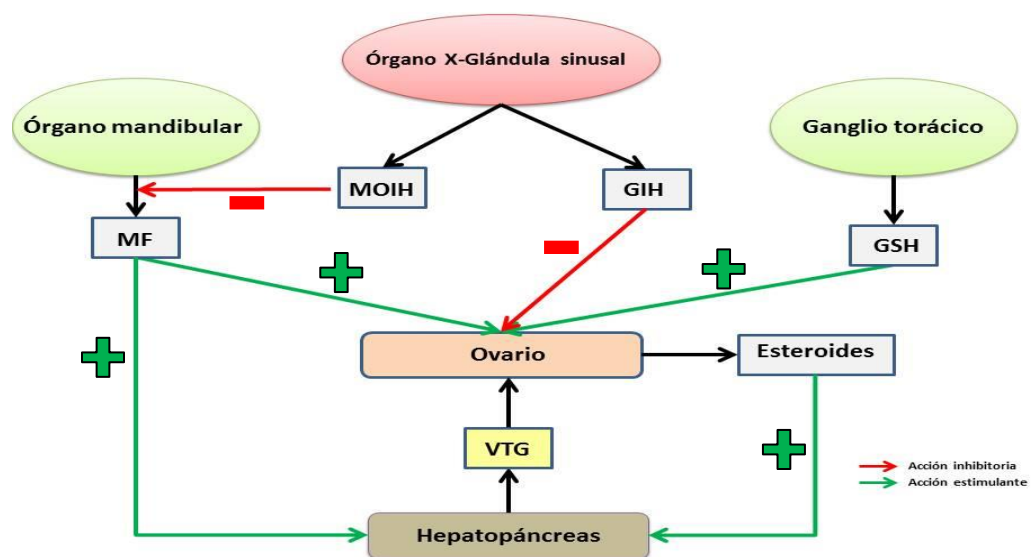


Figura 3. Representación esquemática de los principales controles endocrinos y neuroendocrinos sobre la vitelogenesis y reproducción en decápodos. MOIH: Hormona inhibidora del órgano mandibular; MF: Metil farnesoato; GIH: Hormona inhibidora de la gónada; GSH: Hormona estimuladora de la gónada; VTG: vitelogenina (adaptado y modificado de Nagaraju, 2007).

El interés en la función del proceso reproductivo (gametogénesis/vitelogenesis) y de su control endocrino de hembras de varios decápodos con importancia comercial ha sido mayor en años recientes debido a la disminución de las poblaciones naturales y la necesidad resultante de desarrollar planes de manejo pesquero y pies de cría para la acuicultura comercial (Ibarra *et al.*, 2007; Wilder *et al.*, 2010).

2.1.5. Caracterización molecular de la vitelogenesis en hembras de decápodos.

La localización de los tejidos sintetizadores de las principales proteínas del vitelo ha sido enfoque de diversos estudios, el uso de las técnicas moleculares tales como inmunoensayos (inmunoprecipitación, Western-blot, ELISA, inmunohistoquímica) y la transcriptasa reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) han hecho posible la obtención parcial y completa de las

secuencias del transcrito del gen de vitelina (mRNA_{vg}) de diferentes especies de decápodos (Tabla II) y facilitado la localización de la expresión del mRNA_{vg} así como la identificación de los tejidos de síntesis (Wilder *et al.*, 2010). Por ejemplo en peneidos, recientes estudios basados en la expresión del gen de vitelogenina y cuantificación de mRNA-Vg en hepatopáncreas y ovario han demostrado que la transcripción del gen puede ocurrir en ambos tejidos (Ibarra *et al.*, 2007).

Tabla II. Tamaños del gen de vitelina de algunos decápodos.

Especie	Tamaño (pb)	Referencia
<i>Homarus americanus</i>	8518	Hui <i>et al.</i> , 2007
<i>Metapenaeus ensis</i>	7898	Kung <i>et al.</i> , 2004
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	7956	Xie <i>et al.</i> , 2009
<i>Penaeus monodon</i>	7948	Tiu <i>et al.</i> , 2006
<i>Litopenaeus vannamei</i>	7970	Raviv <i>et al.</i> , 2006
<i>Callinectes sapidus</i>	7881	Thongda <i>et al.</i> , 2015
<i>Portunus trituberculatus</i>	7846	Yang <i>et al.</i> , 2005

Pb: Pares de bases

Dependiendo de la especie, el sitio de síntesis de la vitelina y sus precursores varían y puede ser endógeno, exógeno o ambos. La síntesis de vitelina ha sido encontrada en los ovarios de muchas especies, mientras algunas especies muestran solamente producción exógena y otras utilizan tanto el hepatopáncreas como el ovario para la síntesis de vitelina (Tsukimura *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2006).

Al respecto, en un estudio realizado por Joen *et al.* (2010), se analizó el genoma de *Pandalopsis japonica* encontrando que poseía dos genes diferentes para vitelina, uno de los dos genes se expresaba tanto en ovario como en

hepatopáncreas y el otro gen se expresaba exclusivamente en hepatopáncreas, esta información sugiere que el hepatopáncreas es el principal sitio de expresión del gen en este decápodo y que el ovario es un sitio secundario para la expresión del gen.

En otro estudio, Tsutsui *et al.* (2000) aislaron y clonaron el gen de vitelogenina de *Penaeus japonicus* de hembras en estado vitelogénico y no vitelogénico encontrando que la expresión del transcrito se realizaba en las células foliculares del ovario y en células del parénquima del hepatopáncreas, en las hembras en estado no vitelogénico la expresión del gen tanto en ovario como en hepatopáncreas era insignificante, sin embargo, en hembras vitelogénicas la expresión del gen aumentaba drásticamente en ambos tejidos. En este estudio, los niveles más altos de expresión en el ovario fueron observados durante la etapa temprana de vitelogénesis exógena y posteriormente disminuyó rápidamente, mientras que en el hepatopáncreas, los niveles altos se mantuvieron hasta el inicio de la etapa de maduración.

Al estudiar los niveles de expresión del gen de vitelina en el proceso de la vitelogénesis se puede establecer una correlación entre los niveles de expresión del gen y el desarrollo gonadal de crustáceos decápodos de esta forma es posible obtener información que indique el potencial reproductivo de una especie y establecer métodos no invasivos que permitan identificar el estadio de desarrollo gonadal en el que se encuentra una hembra de determinada población (Ibarra *et al.*, 2007). Anteriormente se han realizado estudios para predecir el estado de madurez gonadal de hembras de *Litopenaeus vannamei*, encontrando que existe una correlación directa entre los niveles de vitelogenina en hemolinfa y el desarrollo de madurez gonadal avanzado (Arcos *et al.*, 2011).

2.2. Biología y fisiología reproductiva de *L. santolla*.

2.2.1. Distribución.

La centolla, nombre común del crustáceo decápodo *Lithodes santolla* se distribuye en la zona austral de Sudamérica. Esta especie habita aguas templadas y frías (3 a 15 °C) subantárticas del Océano Pacífico y Atlántico y se distribuye a profundidades que van desde la submareal (5 m) hasta los 600 m (Retamal y Moyano, 2010). En el Océano Pacífico se distribuye desde la Región X a la XII de Chile [abarcando desde la Isla Grande de Chiloé (Lat. 42°40'36" S Long. 73°59'36" O) hasta Cabo de Hornos (Lat. 55°58'48.5"S Long. 67°17'21"O) (Fig. 3), con altas densidades del crustáceo en el estrecho de Magallanes y canal de Beagle (Vinuesa, 1977). En el Océano Atlántico se distribuye desde Isla Grande en Tierra del Fuego, hasta el Golfo de San Jorge en Argentina y siguiendo la corriente de las Malvinas hasta aguas profundas frente a las costas de Uruguay (Fig. 4) (Vinuesa, 1977; Boschi, 1979).

2.2.2. Características morfométricas.

La centolla es un decápodo bentónico que se caracteriza por tener un caparazón triangular a pentagonal convexo, cuenta con numerosas protuberancias de tamaño similar en forma de espinas y dispuestas irregularmente en toda su superficie, las cuales se encuentran más desarrolladas en los juveniles que en los adultos, y el resto de su superficie es lisa (Vinuesa, 1982; Boschi *et al.*, 1992).

El abdomen en los machos es triangular y simétrico, careciendo de apéndice, mientras que las hembras presentan un abdomen semicircular, asimétrico y bien expandido, que llega a cubrir parcialmente la base de las patas caminadoras y presentan apéndices abdominales (pleópodos) (Vinuesa, 1984).

En su parte dorsal la centolla presenta una coloración que va del rosado al anaranjado y ventralmente su coloración es blanco-amarillenta (Vinuesa *et al.*, 1998) (Fig. 5). El caparazón puede alcanzar una longitud máxima (LC) entre los

190 a 198 mm (Boschi *et al.*, 1984; Vinuesa, 1990) y se tiene registro de organismos que alcanzan un peso superior a los 7 kg (Vinuesa, 1982).



Figura 4. Distribución geográfica (sombreado en naranja) de *L. santolla* en la Patagonia sudamericana (fuente: Vinuesa, 1977).

2.2.3. Ciclo de vida.

De manera general se ha establecido que la especie se reproduce anualmente entre los meses de noviembre y enero (Vinuesa, 1990). El proceso de apareamiento inicia con una migración vertical de los animales a aguas someras donde se agrupan en parejas, la fertilización es externa y ocurre de forma simultánea al desove de las hembras (Lovrich y Vinuesa, 1999). La fecundidad está en función al tamaño de la hembra y varía entre 5500 y 60000 huevos (Vinuesa, 1982). Los huevos fecundados son portados por las hembras durante 9 o 10 meses hasta eclosionar entre los meses de septiembre y octubre en forma de larvas zoea. El tiempo generacional de esta especie varía entre 5 y 6 años (Lovrich y Vinuesa, 1999) (Fig. 6).



Figura 5. Vista dorsal y ventral de macho (izquierda) y hembra (derecha) de centolla (fotos: Manuel Sánchez, CEQUA).

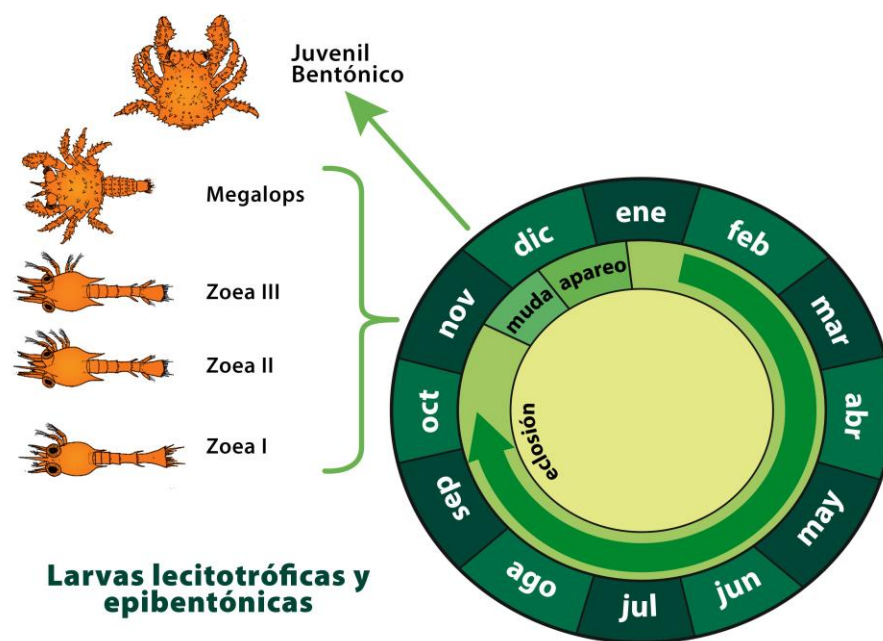


Figura 6. Esquema del ciclo reproductivo de Centolla (fuente: Modificado de Boschi *et al.*, 1984; Campodónico, 1971 y McLaughlin *et al.*, 2004).

En condiciones de laboratorio se ha reportado que el desarrollo larvario puede durar entre 18 y 200 días dependiendo de la temperatura (Vinuesa *et al.*, 1985; Calcango *et al.*, 2004, 2005). Durante el desarrollo larvario se producen tres estadios de larvas Zoea y un estadio postlarva denominado megalopa, la metamorfosis de las larvas megalopas al juvenil del primer estadio bentónico comienza entre noviembre y diciembre y los individuos miden aproximadamente 3 mm de longitud del cefalotórax y (Lovrich y Vinuesa, 1995).

Se ha demostrado que las larvas de centolla pueden sobrevivir y desarrollarse con éxito desde la eclosión hasta la metamorfosis en completa ausencia de alimento, dado que son organismos completamente lecitotróficos y se alimentan de las reservas de nutrientes en los huevos, por lo que no es necesario que los periodos de eclosión coincidan con los periodos de productividad primaria (Lovrich, 1999; Pechenik, 2000; Kattner *et al.* 2003).

2.2.4. Dimorfismo sexual.

La centolla presenta dimorfismo sexual entre machos y hembras (Fig. 5). Este dimorfismo es caracterizado por la diferencia en el tamaño, peso, longitud de las patas caminadoras y tamaño de la quela derecha, mayores en los machos. La diferencia en los tamaños de ambos géneros se debe a que la frecuencia de muda de la especie disminuye conforme a la edad y el género, durante el primer año la centolla muda de 6 a 7 veces, 4 a 5 veces durante el segundo año y 3 veces el tercer año alcanzando una talla de 50 mm de longitud del caparazón (LC) (Lovrich y Vinuesa, 1999).

A partir de este momento los machos comienzan a mudar dos veces al año hasta que alcanzan su madurez morfológica (90 mm de LC) (Lovrich y Vinuesa, 1999; Vinuesa y Lombardo, 1982), después mudan una vez al año hasta alcanzar su talla comercial (110 mm de LC) y los machos mayores a 150 mm de LC mudan cada dos años (Lovrich y Vinuesa, 1999). Las hembras a partir del tercer año empiezan a madurar sexualmente, proceso en el cual gastan más energía, por tal

motivo mudan únicamente una vez al año lo que ocasiona la diferencia de tamaño entre hembras y machos haciendo a estos más grandes (Vinuesa y Lombardo, 1982).

2.2.5. Ovogénesis, vitelogénesis y movilización de reservas en *L. santolla*.

El estudio de los procesos involucrados en la reproducción de decápodos ha sido de gran importancia en especies con interés comercial (camarones, langostas y cangrejos), sin embargo, a pesar de que la centolla es considerada como una de las pesquerías más rentables, el conocimiento sobre su biología reproductiva es escaso.

Al respecto, Lovrich y Vinuesa (1999) caracterizaron el potencial reproductivo de dos lithodidos, *L. santolla* y *Paralomis granulosa* (centolla y centollón) en el canal de Beagle, Argentina. En este estudio se basaron en características reproductivas tales como la fecundidad de la especie, edad de maduración, frecuencia de apareamiento entre otras, para estimar el potencial reproductivo de la centolla, sin embargo, mecanismos tan importantes en la reproducción tales como la ovogénesis, la vitelogénesis y el movimiento de reservas energéticas durante el desarrollo de estos procesos aún no han sido estudiados, por lo que no existe información científica al respecto, adicionalmente, no se ha realizado ningún estudio reproductivo de la centolla en el área de distribución Chilena.

Por su parte, la movilización de reservas en centollas ha sido estudiada en otros aspectos, por ejemplo Comoglio *et al.* (2008) estudiaron los efectos de la inanición sobre la movilización de reservas energéticas del hepatopáncreas en machos donde concluyeron que durante un proceso de inanición la centolla utiliza principalmente proteínas como fuente primaria de energía.

Otros estudios de movilización de reservas han sido realizados en especies cercanas a la centolla, en el cangrejo araña del mediterráneo (*Maja squinado*) se evaluó la composición bioquímica en cada una de las fases de desarrollo larvario (Rotllant *et al.*, 2014) y en un estudio preliminar en hembras del cangrejo rey de

Alaska (*Paralithodes camtschaticus*) se evaluó la bioquímica de lípidos en hepatopáncreas y ovario con un enfoque reproductivo, sin embargo los resultados no fueron concluyentes y se determinó que era necesario un estudio más amplio (Reppond, 2009).

2.3. Importancia de *L. santolla* como recurso pesquero.

La explotación del recurso centolla inicio alrededor de 1928 principalmente en el estrecho de Magallanes (Díaz, 1988). Durante las primeras décadas de pesca se obtuvieron bajos rendimientos aproximados a las 150 toneladas anuales, no se disponía de embarcaciones de transporte, y solo se trabajaban tres meses al año; todo el producto de la pesca se destinaba únicamente al mercado nacional (Cárdenas *et al.*, 1987). Las estadísticas pesqueras inician formalmente desde 1945, mostrando hasta el presente un aumento sostenido de los desembarques y el esfuerzo de pesca (Díaz, 1988; Cárdenas *et al.*, 1987).

Hasta el primer trienio de la década de los 70 los desembarques fluctuaban entre 200 y 450 toneladas anuales (Hernández y Díaz, 1986; Cárdenas *et al.*, 1987). Las áreas de pesca en ese entonces se ubicaban en el sector norte de la Isla Tierra del Fuego, incorporándose posteriormente otras áreas como: Isla Dawson, Seno Almirantazgo, el sur de la Península de Brunswick y Seno Otway, límites que se mantuvieron hasta 1974 (Guzmán *et al.*, 2004).

Al final de la década de los 70 y durante la década de los 80 se observó un incremento acelerado y sostenido en los desembarques (Fig. 7) debido al aumento en el esfuerzo pesquero caracterizado por un mayor número de embarcaciones utilizadas en la pesquería así como una gran expansión geográfica de los límites norte y sur del área de pesca y la incorporación de áreas expuestas al Océano Pacífico en el sector occidental del Estrecho de Magallanes (Cárdenas *et al.*, 1987; Pesca y Acuicultura, 2014).

A partir de 1996 la pesquería presenta un repunte progresivo, fluctuando entre los años 2000 - 2013 en valores cercanos a las 3.000 toneladas. Durante el año 2013

se desembarcó, de acuerdo a la cifra oficial del Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura, un total de 4.716 ton de centolla (Fig. 7).

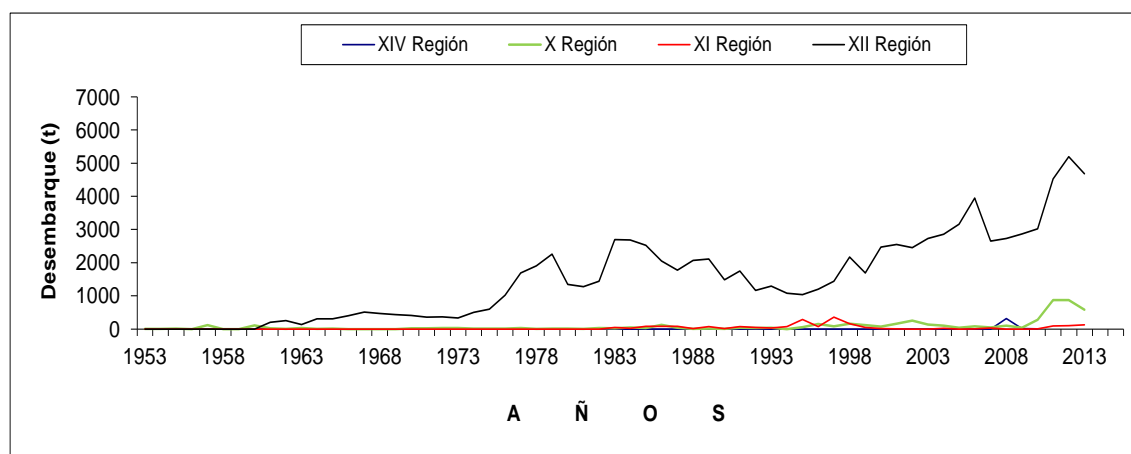


Figura 7. Desembarque de centolla (*L. santolla*) en toneladas entre los años 1953 a 2013 (fuente: Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, 2014).

Esta misma temporada, se dispuso de registro de desembarque de 424 embarcaciones artesanales. A principios de octubre de 2014 se registra un total desembarcado de 2.758 toneladas de centolla y un total de 359 embarcaciones artesanales operando. A la misma fecha se registran 674 embarcaciones autorizadas y pudiendo operar en estas embarcaciones, cualquier pescador inscrito en la XII Región (Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, 2014).

Por otra parte, la actividad extractiva de la centolla, en aguas interiores de la región de Magallanes es realizada exclusivamente por el sector pesquero artesanal. Y aunque los desembarques anuales de centolla en comparación a otras pesquerías del país representa un volumen insignificante dentro del contexto nacional, sin embargo, y dado que el precio de exportación es superior al de los otros recursos exportados, la centolla posee un gran valor económico, por lo que se considera como una de las actividades pesqueras más rentables en la región de Magallanes y Antártica chilena (Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, 2014).

2.3.1. Medidas de administración pesquera de la centolla.

Actualmente, el recurso es explotado bajo la categoría de plena explotación (Res. Ex. N° 3556/2014) a lo largo de toda la costa desde el archipiélago de Cabo Hornos hasta el sector de Puerto Edén (regiones X, XI, XII y XIV), teniendo como principal puerto de desembarque el de Punta Arenas en la región de Magallanes siendo esta región la que presenta los mayores volúmenes de extracción a nivel nacional; reportándose 4,548.69 toneladas para el año 2013 (Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, 2014).

El principal objetivo de las reglamentaciones impuestas a las pesquerías ha sido resguardar el potencial reproductivo, por lo que en la actualidad se administra mediante la estrategia conocida como SSS, (Size, Sex & Season) con regulación de talla, prohibición de desembarque de hembras y veda estacional (que protege el proceso reproductivo). Complementariamente se dispone de regulación del esfuerzo pesquero, lo que se realiza mediante la ordenación de los artes de pesca y la mantención del número actual de embarcaciones, prohibiéndose el ingreso de nuevas unidades de esfuerzo (Pesca y Acuicultura, 2013).

Específicamente las regulaciones son; una veda biológica que va del 01 de diciembre al 30 de junio asegurando de esta manera que los individuos puedan reproducirse antes de la temporada extractiva. No se permiten registros de pesca artesanal de la X, XI, XII, XIV, regiones (Res. Ex. N° 3556/2014). Sólo se permite el uso de trampas para su pesca (Res. Ex. N° 442/1981) ya que ha demostrado ser el arte de pesca menos invasivo tanto para la especie objetivo como para la fauna de fondo. La talla mínima legal para la XII región (TML) es de 11 cm de LC (medidos desde el extremo distal del rostro a la base del caparazón) (D. Ex. N° 375/1987); ya que los individuos comienzan su madurez funcional (tamaño en que el macho puede sujetar a la hembra en la etapa precopulatoria) a partir de los 8-9.5 cm de LC, con esta medida se permite a una fracción de la población reproducirse antes ser pescados. Está prohibida la captura y el desembarque de

hembras con la finalidad de asegurar el reclutamiento de nuevos individuos a las siguientes generaciones (D. Ex. N° 443/1990) (Pesca y Acuicultura, 2013).

2.3.2. Retos actuales de la pesquería de la centolla en la región XII.

La gestión y fiscalización de la extracción del recurso centolla tiene grandes dificultades en la región debido a la alta dispersión de los caladeros de pesca y la compleja y vasta zona geográfica de los fiordos estuarinos (Fig. 8). Esto facilita a los pescadores capturar ejemplares machos debajo de la talla mínima legal, capturar hembras, usar buceo autónomo, redes y el procesamiento clandestino. Lo que repercute en el deterioro de las poblaciones de centolla en la región de Magallanes y Antártica chilena (región XII).

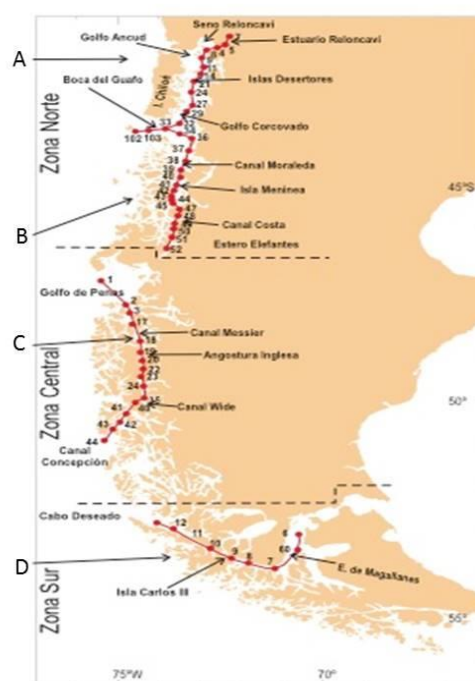


Figura 8. Modelo esquemático de la circulación vertical en las tres zonas de los fiordos australes: A) boca del Guafo a estuario Reloncaví; B) boca del Guafo a estero Elefantes; C) golfo de Penas a canal Concepción; D) estrecho de Magallanes (fuente: Sievers y Silva, 2006).

La información biológica del recurso se concentró a finales de los años 70's e inicio de los años 80's, abordando preferentemente, aspectos como estructura de tamaño, relación talla-peso, fecundidad, talla de primera madurez sexual, proporción de sexo, captura por unidad de esfuerzo, parasitismo, crecimiento relativo, mortalidad natural, fauna acompañante, desarrollo gonadal, desarrollo larvario, periodo de eclosión de embriones, periodo de transporte de embriones, periodo de muda, copula y migraciones (Daza *et al.*, 2009).

Posteriormente en los años 90's y 2000 se han realizado varias inspecciones biológico pesqueras prácticamente con los mismos objetivos que los realizados durante los años 80's (Guzmán *et al.*, 2004), junto con otros estudios sobre larvas y juveniles (Amin y Comoglio, 2002; Kattner *et al.*, 2003; Lovrich *et al.*, 2003; Anger *et al.*, 2004; Calcagno *et al.*, 2004). Aun cuando los ejemplares juveniles y adultos son claramente diferenciables, no se conocen con precisión las áreas de desove de cada especie y la discriminación larval, en las zonas de asentamiento, es casi imposible determinarlas.

Para evitar la sobreexplotación y el colapso de la pesquería en la Región de Magallanes, resultaría interesante ampliar el conocimiento sobre su biología, su genética poblacional, su fisiología y genómica-transcriptómica reproductiva. Avanzar en el conocimiento de estos aspectos son de gran utilidad en la administración de la pesquería, al emplear instrumentos de manejo específicos (periodos de veda, extensión de estos, rotación de áreas de extracción) y el desarrollo de biotecnologías de cultivo permitiendo con esto la conformación de pies de cría y el inicio de programas de mejoramiento genético.

2.4. Biotecnologías para el estudio de la biología y fisiología reproductiva de la centolla.

Para lograr un avance en el estado de conocimiento de la biología y fisiología reproductiva de la centolla, como el que se ha logrado en otros decápodos

(camarones, langostinos y langostas) se requiere del uso de una serie de herramientas biotecnológicas. Las principales técnicas utilizadas para el estudio reproductivo en decápodos han sido aquellas caracterizadas por su amplia capacidad de proveer información útil y precisa sobre los diferentes mecanismos involucrados en este proceso, dentro de las cuales se encuentran las técnicas histológicas, histoquímicas, bioquímicas y moleculares.

2.4.1. Herramientas histológicas, histoquímicas y bioquímicas.

En decápodos los cambios morfológicos externos durante el desarrollo reproductivo de las hembras se han documentado mediante observación directa bajo el microscopio o a partir de fotografías y videograbaciones en las que se registra el tamaño, forma de larva, locomoción y alimentación (Adiyodi, 1985; Rodríguez-Jaramillo, 2016. Comp. Pers.). Por otra parte los cambios anatómicos internos proveen información detallada sobre el grado de desarrollo de los ovocitos, y se documentan mediante cortes histológicos (Varadarajan y Subramoniam, 1980; Ryazanova, 2005; Flamini *et al.*, 2009; Ravi, 2013). Por otra parte, la histología también ha sido utilizada en el manejo y el diagnóstico de algunas enfermedades (Ravi, 2013).

Las tinciones más comúnmente empleadas son hematoxilina-eosina y Tricomico de Mallory (Howard y Smith, 1983) y entre otras recientemente utilizadas para describir la estructura y morfología de los ovocitos durante los procesos de ovogénesis y vitelogénesis se han empleado la tinción policrómica, Tricrómica de Masson y Fulgen Azul de Picrometilo (Arcos *et al.*, 2005, 2011). Los cortes histológicos y la aplicación de diferentes tinciones pueden proporcionar información más precisa y detallada sobre el desarrollo de la ovogénesis y vitelogénesis de varias especies de organismos marinos (Rodríguez-Jaramillo 2016. Com. Pers.).

El estudio de la composición histoquímica y bioquímica de los procesos de ovogénesis y vitelogénesis es una herramienta útil para conocer los patrones de

acumulación de reservas y conocer de manera indirecta los requerimientos energéticos y nutricionales durante su desarrollo (Cohen *et al.*, 2015). La identificación del tipo de sustrato energético que usan preferentemente las hembras de crustáceos en su metabolismo se ha determinado a partir de experimentos basados en la acuicultura controlada (Bembe, 2009) o mediante la cuantificación de la pérdida de reservas que tienen lugar durante los procesos de ovogénesis y vitelogénesis (Li *et al.*, 2010).

Las técnicas histoquímicas permiten visualizar componentes bioquímicos específicos en los tejidos por medio de tinciones que se aplican directamente sobre cortes de tejido fijados histológicamente. Se utilizan colorantes del grupo de los Sudanés (Gabe, 1968), Aceite rojo 0 y Sulfato de Azul Nilo (Cain, 1947) para la detección de lípidos, mientras que la tinción con azul alciano y reactivo de Schiff (Azul Alciano – PAS) es la más utilizada para teñir los carbohidratos (mucinas) neutros y ácidos (Palomo, 1960). Diferentes reacciones como la de Millon, diazoica, xantoproteica, y Sacaguachi, son las técnicas utilizadas para la estimación de proteínas (Palomo, 1960). Todas estas reacciones determinan únicamente una fracción de los aminoácidos constituyentes de cualquier proteína en particular (Palomo, 1960).

La evaluación de los patrones bioquímicos se realiza mediante métodos cuantitativos y semicuantitativos. En el primero caso se cuantifican los componentes bioquímicos gravimétricamente o espectrofotométricamente, mientras que en el segunda se emplean técnicas de histoquímica. El método espectrofotométrico se basa en determinación directa del peso del componente bioquímico de interés una vez que el tejido ha sido homogenizado con solventes específicos para proteínas, lípidos o carbohidratos, según sea el caso, los cuales reaccionan con reactivos que generan un color cuya absorbancia se determina espectrofotométricamente a una longitud de onda característica que se elige de acuerdo al color. Dicha absorbancia se compara con aquella de una sustancia de composición parecida y conocida (solución estándar) con la cual se ha generado

una curva de calibración. Esta última se utiliza para estimar la cantidad real del componente en la muestra experimental problema.

Dentro de los principales métodos para la determinación de proteínas por métodos espectrofotométricos se utilizan diferentes reactivos que interaccionan con los péptidos como azul de croomasie, ácido bicinconínico, cobre y ácido fosfomolibdotungstico (Bradford, 1976; Smith *et al.*, 1985; Lowry *et al.*, 1951). Para la cuantificación de los carbohidratos se utilizan compuestos químicos como fenol y antrona (Roe, 1955; Dubois *et al.*, 1956). En el caso de los lípidos totales el principal método utilizado es el de la sulfofosfovainillina (Marsh y Weinstein, 1966), mientras que para los triglicéridos se utilizan diferentes métodos químicos y enzimáticos (Roca *et al.*, 2003).

2.4.2 Herramientas moleculares (genómicas y transcriptómicas)

La caracterización de genomas y en específico la búsqueda de patrones de genes implicados en procesos biológicos es una tarea compleja. No obstante los recientes avances en tecnologías de secuenciación masiva (*high-throughput sequencing*) y la mayor disponibilidad de plataformas NGS (*next generation sequencing*) han permitido que numerosos procesos biológicos complejos como la reproducción, el crecimiento y resistencia a patógenos sean posibles de ser elucidados a nivel molecular. Dentro de las plataformas NGS disponibles a nivel comercial, es posible generar gran cantidad de transcritos (ESTs) a través de pirosecuenciación, secuenciación por síntesis de Illumina y secuenciación por ligación de Applied Biosystems. Como ejemplo, mediante un proceso de secuenciación en un equipo HiSeq 2500 de Illumina se generan 600 Gb (seiscientos mil millones de lecturas) en aproximadamente 11 días de análisis (Laboratorio de Bioinformática IBT-UNAM, México). Por lo que esta tecnología permite generar aproximadamente 3 billones de ESTs al finalizar el proceso de secuenciación. Este avance significativo en la forma de buscar y caracterizar a nivel molecular genes implicados en procesos biológicos complejos, nos permite

abordar la problemática sobre la falta de conocimiento que existe sobre el proceso reproductivo (ovogénesis y vitelogénesis) de las hembras de centolla y sobre la falta de soluciones o estrategias para el manejo de este recurso.

3. JUSTIFICACIÓN

La centolla subantártica (*L. santolla*) es un recurso pesquero emblemático de la Región de Magallanes con una tradición de más de 70 Años y es considerada actualmente como una de las pesquerías más rentables y con mayor valor económico dentro de los crustáceos, tanto para la Región de Magallanes y Antártica chilena como para Chile. Sin embargo, a pesar de su importancia la información sobre los diversos procesos reproductivos, genéticos y genómicos de estos organismos es limitada o inexistente, lo que limita el establecimiento de estrategias de manejo y regulación del recurso y el desarrollo de biotecnologías de cultivo basadas en el conocimiento sobre su biología reproductiva y genética.

Uno de los procesos fundamentales en el desarrollo reproductivo de las hembras de los decápodos es la vitelogénesis, mediante la cual se sintetizan, se transportan y se almacenan diversas reservas bioquímicas principalmente proteínas denominadas vitelinas, las cuales constituyen la principal fuente de alimentación durante el desarrollo embrionario. El estudio y la caracterización morfohistoquímica, bioquímica y molecular de la vitelogénesis, ha sido una herramienta útil para determinar la condición reproductiva de hembras (estadio de madurez y capacidad reproductiva) de decápodos de importancia comercial y ha sido de gran utilidad para conocer los mecanismos que controlan el proceso reproductivo permitiendo el desarrollo de biotecnologías de cultivo.

En el marco de este contexto en este estudio se planteó realizar la caracterización morfológica, bioquímica y molecular de la vitelogénesis de las hembras de centolla (*L. santolla*) con el fin de contribuir con conocimiento que pueda permitir una mayor comprensión del proceso reproductivo de esta especie y pueda ser de utilidad y ayuda en el establecimiento de estrategias de manejo sustentable y al establecimiento de biotecnologías de cultivo de esta especie.

4. HIPÓTESIS

Si, la vitelogénesis es un proceso directamente relacionado con el avance de los estadios de maduración gonádica, entonces, se presentaran cambios morfohistológicos, bioquímicos y moleculares durante la vitelogénesis de las hembras del crustáceo subantártico centolla (*L. santolla*).

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Caracterizar morfohistológica, histoquímica, bioquímica y molecularmente el proceso de vitelogénesis de hembras del crustáceo subantártico centolla (*L. santolla*).

5.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar morfohistológica e histoquimicamente la vitelogénesis de hembras del crustáceo subantártico centolla (*L. santolla*).
2. Analizar la movilización de las reservas energéticas durante la vitelogénesis de hembras del crustáceo subantártico centolla (*L. santolla*).
3. Caracterizar molecularmente la vitelogénesis de hembras del crustáceo subantártico centolla (*L. santolla*).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Origen y obtención de los organismos.

La obtención de los organismos se realizó en dos etapas. La primera etapa se realizó durante los meses de octubre a diciembre para la captura y muestreo de un total de 35 machos adultos con la finalidad de ser utilizados como control negativo en las distintas determinaciones. Posteriormente entre los meses de febrero y marzo se realizó la captura y muestreo de un total de 150 hembras. La captura de los organismos se llevó a cabo en embarcaciones centolleras tradicionales de pesca comercial en las distintas zonas de la región de Magallanes y Antártica chilena (Anexo I) mediante el uso de trampas centolleras. Inmediatamente después de la captura las centollas fueron colocadas en tinas internas de la embarcación con agua marina para mantenerlas vivas.

Los organismos fueron recibidos en el puerto de desembarque y transportados vivos en tinas con agua hacia el Laboratorio de Genética Molecular y Genómica del Centro Científico Regional Fundación CEQUA localizado en la ciudad de Punta Arenas, Chile. En algunas ocasiones, debido a la lejanía del punto de pesca con la ciudad, fue necesario realizar el muestreo de dichos organismos en la embarcación a fin de evitar un daño a la integridad de las muestras.

6.2. Disección y toma de muestras.

Se tomaron variables morfométricas (peso total, longitud y ancho de caparazón) de cada uno de los organismos y se realizaron las disecciones y la toma de muestras de cada uno de los tejidos analizados (gónada y hepatopáncreas) y de hemolinfa. La obtención de hemolinfa se realizó con un método de extracción no invasivo estandarizado por el grupo del laboratorio de Fundación CEQUA (comunicación personal) (Fig. 9). El método consistió en obtener un volumen de ~500 μ L de hemolinfa con una jeringa para insulina de 1mL previamente humedecida en una solución anticoagulante de EDTA (Ácido

Etilendiaminotetraacético, $C_{10}H_{16}N_2O_8$) al 10%. Cada muestra fue transferida a tubos eppendorf de 1.5mL y se centrifugaron a 5000 rpm a 4 °C por 5 minutos. Se colectó el sobrenadante y las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta su envío al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) en la Paz, B.C.S., México, en donde se realizaron los diferentes análisis de composición bioquímica.

Inmediatamente después de la toma de hemolinfa se abrió el caparazón y con una navaja, pinzas y guantes se obtuvieron las muestras necesarias de hepatopáncreas y de gónada de la zona ventral media de cada una de las hembras, en el caso de los machos se tomó una muestra del conducto deferente y otra de hepatopáncreas (Fig 9). Cada una de las muestras de cada tejido se colocó inmediatamente en tubos eppendorf de 1.5mL con una solución de RNA-*later*® (Ambion) para los análisis moleculares de expresión génica. Estas muestras se almacenaron a -20 °C hasta su traslado al CIBNOR.

Otra muestra de gónada de cada hembra fue colocada en un cassette histológico con su etiqueta correspondiente y embebida en solución Davidson (Humanson, 1972). Estas muestras se almacenaron a temperatura ambiente por 48 horas y después se pasaron a alcohol al 96% y se trasladaron al Laboratorio de Histología e Histoquímica del CIBNOR para ser utilizadas en la caracterización morfohistológica de la vitelogénesis. Por último, muestras de gónada y hepatopáncreas de cada hembra fueron colocadas en cassettes histológicos con su respectiva etiqueta y embebidas en una solución de paraformaldehído al 4%.

6.3. Caracterización morfohistológica e histoquímica de la vitelogénesis.

6.3.1. Preparación de las muestras para los análisis histológicos.

Las porciones de gónada embebidas en solución Davidson se procesaron mediante técnicas histológicas ya establecidas y estandarizadas en el Laboratorio de Histología e Histoquímica del CIBNOR.



Figura 9. Toma de muestras de hemolinfa y tejidos.

Las muestras fueron sometidas a un proceso de deshidratación sumergiéndolas en una serie de alcoholes de menor a mayor concentración (70 al 100 %), después de este proceso se aclararon con xileno, y se incluyeron en parafina. Posteriormente se realizaron cortes histológicos de cada muestra en un micrótopo rotatorio (Leica RM 2155), con un grosor de 4 micras. Cada uno de los cortes se extendió en un baño de teflón con agua destilada a 40°C en parafina y a temperatura ambiente en resina (Lab-Line 26103) y fueron montadas en un portaobjetos para su posterior tinción.

6.3.2. Caracterización morfológica del desarrollo gonadal.

Para la caracterización del desarrollo gonadal los cortes histológicos de cada muestra de gónada se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (Humanson, 1972) utilizando un multiteñidor automático (Leica ST5020). Las laminillas teñidas fueron

examinadas en un microscopio Olympus BX 50 utilizando óptica de campo claro y de cada corte se generaron imágenes con los objetivos 4x, 10x, 20x, 40x, 60x y 100x mediante el sistema de análisis de imágenes ImagePro Plus versión 6.0.

La caracterización del desarrollo gonadal se basó en el análisis morfológico de los ovocitos de cada muestra mediante la interpretación de las imágenes digitalizadas anteriormente, considerando los siguientes factores: tamaño, forma, estructura y desarrollo de los ovocitos, características internas y composición de reservas, clasificándolos en diferentes tipos, utilizando como base las descripciones morfológicas del ovario propuestas para el camarón *Penaeus japonicus* (Yano, 1988), para *Panulirus japonicus* (Minagawa y Satoru, 1997) y para *Maiopsis panamensis* con estrategia de desove en saco ovífero (López-Martínez *et al.*, Sometido).

A partir de los ovocitos con un corte aproximado en un plano ecuatorial del nucleoplasma se determinaron los estadios y sub-estadios de la ovogénesis. Los ovarios fueron clasificados de acuerdo al estadio de desarrollo ovárico en cinco estadios (0 a IV) y diez sub-estadios. El estadio de desarrollo de cada ovario fue determinado por la presencia del subestadio de mayor desarrollo ovárico encontrado en cada espécimen (Rodríguez-Jaramillo, comunicación personal).

Las mediciones de los ovocitos se realizaron de las imágenes digitalizadas de cada gónada seleccionando en promedio 30 ovocitos con nucleoplasma bien definido por hembra, delimitando el perímetro de cada ovocito y el perímetro de su nucleoplasma de forma manual para estimar el área del ovocito y del nucleoplasma mediante el programa ImagePro Plus. La calibración del sistema de análisis de imágenes se hizo mediante una reglilla digital micrométrica para los objetivos 4x, 10x, y 20x.

El área total (A_T) de cada ovocito, del nucleoplasma y del ovoplasma fueron estimados digitalmente en las tres regiones de cada ovario (anterior, medio y posterior), usando el analizador de imágenes "ImagePro Plus". Solamente los

ovocitos que mostraron nucleoplasma, cortados aproximadamente en el plano medio transversal fueron considerados en el análisis morfométrico y estadístico así como en la asignación del estadio de desarrollo (Arcos *et al.*, 2005; Arcos *et al.*, 2011).

Con la estimación del área de los ovocitos (A_o) se calculó el diámetro teórico (DT) (Saout *et al.*, 1999) estandarizando las medidas con base a la fórmula de la circunferencia:

$$DT = \sqrt{\frac{4A_o}{\pi}} \quad (1)$$

Dónde:

D_T = diámetro teórico

A_o = área del ovocito

π = 3.1416

Todas las mediciones realizadas se registraron en una hoja de cálculo en Excel para su posterior análisis estadístico.

La validación de la clasificación de los estadios y sub-estadios de la ovogénesis determinada en este estudio, se realizó mediante la transformación de los datos cuantitativos obtenidos en el proceso de medición a Log_{10} para su posterior análisis de varianza (ANOVA) de una vía (Zar, 1999), en el cual el factor fue la clasificación en estadios y sub-estadios asignados y las variables dependientes fueron las características cuantitativas obtenidas de cada tipo de ovocito (área total (A_T) y diámetro teórico (DT) de cada ovocito). Este análisis se realizó en base a la metodología propuesta por Arcos *et al.* (2011).

6.3.3. Caracterización histoquímica de la vitelogénesis.

6.3.3.1. Histoquímica de lípidos.

La histoquímica de lípidos se realizó utilizando la técnica del sudan negro el cual es un reactivo que por solubilidad tiene preferencia por los componentes lipídicos de los tejidos (Bayliss, 1984). Tiñe una amplia variedad de lípidos que comprenden principalmente fosfolípidos, así como esterios de colesterol y triglicéridos en tonalidades que van de azul oscuro a negro dependiendo del tipo de lípido (Rodríguez-Moscozo y Arnaiz, 1998). La tinción se realizó en laminillas con cortes de gónada (preparadas como se describió anteriormente) utilizando un multiteñidor automático (Leica ST5020). Una vez teñidas las laminillas fueron observadas al microscopio (Olimpus BX 50) utilizando óptica de campo claro y de cada una se generaron imágenes con el objetivo 10x utilizando el programa de análisis ImagePro Plus versión 6.0.

6.3.3.2. Cálculo del índice de lípidos.

El índice de lípidos fue calculado como se describe por Rodríguez-Jaramillo *et al* (2008). Utilizando el software de análisis de imágenes ImagePro Plus (versión 6.0) se determinó el área de cobertura de los píxeles de un color determinado generado por la tinción realizada (sudan negro) en tres imágenes y se dividió entre el área total de las tres imágenes (ambas expresadas en μm^2) como lo indica la siguiente relación:

$$\frac{SAC}{AT} \times 100 \quad (2)$$

Donde SAC es la suma de las áreas de cobertura del color específico de la tinción (Sudan negro) en 3 imágenes expresado en número de píxeles normalizados por área (μm^2) y AT es la suma del área total de las 3 imágenes, expresada en número de píxeles normalizados por área (μm^2).

Para estimar las diferencias morfométricas e histoquímicas entre los estadios de desarrollo ovárico y los subestadios o tipos de ovocitos que los componen, los valores de los índices de lípidos expresados en porcentaje se transformaron a

Arcoseno (Zar, 1999) para realizar un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, en el cual el factor fue la clasificación de estadios y sub-estadios asignados y la variable dependiente fue el índice de lípidos. Este análisis se realizó en base a la metodología propuesta por Arcos *et al.* (2011).

En los casos donde se obtuvieron diferencias significativas ($P < 0.5$) se realizó una prueba de comparación de medias de Tukey (Zar, 1999). Los análisis estadísticos fueron realizados al 95% de confianza. Todos los análisis fueron realizados usando el módulo GLM (General Lineal Model) del Software STATISTICS versión 10.

6.4. Análisis de la movilización de reservas energéticas durante la vitelogénesis.

6.4.1. Manejo de muestras y obtención de extractos de trabajo.

6.4.1.1. Hemolinfa.

Para las muestras de hemolinfa se realizó una centrifugación a 5,000 rpm durante 5 min a 4°C en una centrifuga refrigerada (Eppendorf 5810 R, NY-USA). Las determinaciones bioquímicas se realizaron tomando el volumen necesario del sobrenadante.

6.4.1.2. Tejidos.

Los extractos de trabajo se prepararon de acuerdo al tipo de muestra. En el caso de las muestras de tejidos (gónada y hepatopáncreas) estas fueron puestas a congelar en un ultra congelador a -80°C (Fisher Scientific, L813U030, Ohio-USA). Una vez congeladas, se procedió a ponerles parafilm en la boca del tubo, haciendo algunas perforaciones con una aguja para que pudiera salir el vapor del tubo y se volvieron a colocar en el ultra congelador.

Después de que se congelaron totalmente, las muestras se colocaron en frascos para liofilizadora y se pusieron en una liofilizadora VirtTis (BenchTop 3.5, NY-USA) a una temperatura máxima de -30°C, y una presión máxima de 100 mTorr,

condiciones adecuadas para un óptimo proceso de sublimación del agua presente en los tejidos. Estas condiciones mínimas permanecieron constantes durante el tiempo que duro la liofilización (aproximadamente 18 horas).

Una vez que las muestras estuvieron completamente deshidratadas, se les retiró el parafilm a los tubos y se pesaron en una balanza analítica. Una cantidad entre 0.0200 y 0.0250 g de muestra fue colocada en otro tubo eppendorf de 1.5 mL previamente etiquetado. A cada tubo se le agregó 1 mL de agua destilada y se homogenizó utilizando perlas de vidrio y agitación mecánica, para desintegrar el tejido, con ayuda de un homogeneizador MPI (Fast Prep-24, CA-USA). Al homogenizado resultante se le denominó "extracto de trabajo" y a partir del mismo se tomaron los volúmenes necesarios para realizar las determinaciones bioquímicas correspondientes. Todos los extractos de trabajo se mantuvieron en congelación a -20 °C para su conservación.

6.4.2. Determinación de proteínas totales.

En la determinación de proteínas totales se utilizó la técnica del Ácido Bicinconínico o BCA, esta técnica se basa en el principio de que las proteínas reducen los iones cúpricos a iones cuprosos bajo condiciones alcalinas. Los iones cuprosos reaccionan con el ácido bicinconínico, (sal sódica verdosa) para formar un complejo que produce un color morado (Fig. 10). La intensidad del color formado es proporcional al contenido proteico de la muestra. Se utilizó una solución reactiva comercial de Sigma (solución de ácido bicinconínico B9643 y solución de sulfato de cobre II C2284).

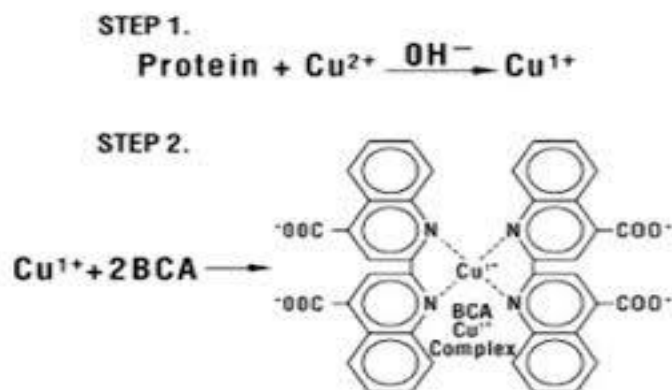


Figura 10. Principio químico para determinación de proteínas totales por el método del ácido Bicinconínico (BCA) (tomado de *Smith et al.*, 1985).

Para el caso de hemolinfa, se realizó una dilución 1 a 100 con agua destilada. Para los tejidos se usó una alícuota de 10 μ L del homogenizado la cual se puso a digerir en 100 μ L de NaOH 0.1N durante 120 minutos, posteriormente se tomaron 25 μ L del digerido o de la muestra diluida de hemolinfa y se colocó en el fondo de una microplaca. Por último se le agregó el reactivo preparado de BCA y se incubo a 60°C durante 15 minutos, después se leyó la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro de placas (Termo, Multiskan spectrum, Vantaa-Finlandia) a 562 nanometros (nm).

Para calcular las concentraciones se utilizó una solución estándar con una concentración de 2mg/mL de albúmina bovina, con la cual se preparó una curva estándar haciendo diluciones en proporción 1:2 en solución salina hasta tener concentraciones, de 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 y 0.03125 mg/mL de proteína y se utilizó solución salina como blanco.

La concentración de proteínas se calculó con las siguientes formulas:

$$\text{Concentración de proteínas en hemolinfa (mg/mL)} = (\text{Abs} \times \text{FD}) / (\text{m} \times 100) \quad (3)$$

Concentración de proteínas en tejidos (mg/g) = (Abs x FD) / (m x peso de la muestra) (4)

donde: Abs es el valor de absorbancia obtenido, FD es el factor de dilución y m es la pendiente en la curva estándar.

6.4.3. Determinación de carbohidratos totales.

La medición del contenido de carbohidratos totales únicamente se realizó en los tejidos (gónada y hepatopáncreas) utilizando el método de antrona, la cual forma un compuesto verde en medio ácido fuerte (Ácido sulfúrico) con ciertos carbohidratos y sacáridos, en especial con azúcares y almidones. La reacción de carbohidratos con ácido sulfúrico produce un derivado del furfural el cual reacciona con la antrona produciendo un complejo de color verde que tiene su máximo de absorción a los 620 nm (Fig. 11).

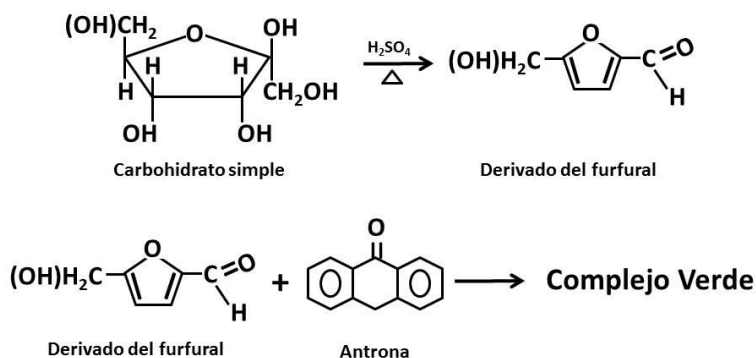


Figura 11. Principio químico para la determinación de carbohidratos totales por el método de Antrona (adaptado de Grande *et al.*, 1953).

Antes de realizar la determinación fue necesario dar un tratamiento a las muestras a fin de precipitar las proteínas contenidas en la misma, ya que estas interfieren en la medición de los carbohidratos, para esto se tomaron 0.2 mL del homogenizado

de cada muestra y se mezclaron con 0.2mL de ácido tricloroacético (TCA) al 20% en tubos eppendorf de 0.65mL. Los tubos se centrifugaron a 3600 rpm (1376 g) por 10 minutos a 4°C en una centrifuga refrigerada (Eppendorf 5810 R, NY-USA) y se recuperó el sobrenadante en tubos limpios.

Se tomó 0.1mL de sobrenadante y se colocó en un tubo de vidrio al cual se le agregó 1mL de solución de antrona al 0.1% diluida en H₂SO₄ al 72%. Las muestras se calentaron en baño maría a 90 °C durante 5 minutos y se enfriaron en un baño de hielo. Finalmente se transfirió el contenido de cada tubo a una placa de 96 pozos y se leyó su absorbancia en un espectrofotómetro de placas (Termo, Multiskan spectrum, Vantaa-Finlandia) a 620 nm.

Para determinar la concentración de carbohidratos totales en cada muestra se realizó una curva estándar. Utilizando una solución estándar de carbohidratos que contiene 5mg/mL se prepararon diluciones en proporción 1:2, en 500µL de TCA, quedando concentraciones de 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625, 0.078125 mg/mL de carbohidratos.

La cantidad de carbohidratos se calculó con la siguiente formula:

Concentración de carbohidratos en tejidos (mg/gr) = (Abs x FD) / (m x Peso de la muestra) (5)

donde: Abs es la absorbancia obtenida para cada muestra, m es la pendiente en la curva estándar y FD es el factor de dilución.

6.4.4. Determinación de lípidos totales.

La concentración de lípidos totales se realizó utilizando el método de la sulfosfosvainillina según Barnes y Balckstock (1973). En este método los lípidos se hacen reaccionar con ácido sulfúrico en caliente y como resultado de la reacción se generan iones carbonio que subsecuentemente reaccionan con el éster de vainillin fosfato produciendo un complejo de coloración purpura (Fig. 12).

La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de lípidos totales presente en la muestra ensayada.

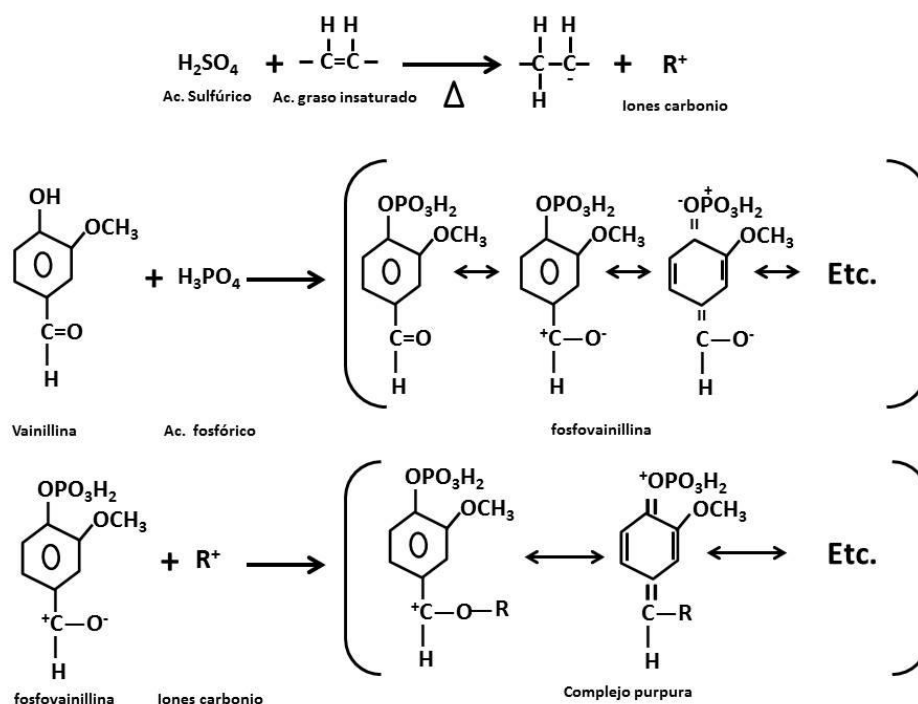


Figura 12. Principio químico para la determinación de lípidos totales por el método de sulfofosfovainillina (modificado de Knight *et al.*, 1972).

Para realizar la determinación una alícuota de 25 μL de cada muestra (hemolinfa y homogenizado) fue colocada en tubos de vidrio y se les agregó 0.25mL de ácido sulfúrico concentrado, posteriormente las muestras se incubaron a baño maría a 90°C por 10 minutos. Después del baño maría los tubos se enfriaron en un baño de hielo y se tomaron 20 μL de cada tubo para colocarlos en una microplaca de 96 pozos. A cada pozo se le agregó una solución reactiva consistente en

fosfovainillina al 0.2% en ácido sulfúrico al 80% y se dejó incubar la placa por 40 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se tomó la lectura de la placa en un espectrofotómetro de placas (Termo, Multiskan spectrum, Vantaa-Finlandia) a los 540nm.

Al mismo tiempo que las muestras, se hizo reaccionar una curva de calibración la cual se preparó utilizando una solución estándar de lípidos (Lin-Trol Sigma L2648) que contiene 20mg/mL. De ésta solución se prepararon diluciones en proporción 1:2, en 1mL de solución salina, quedando concentraciones de 10, 5, 2.5 1.25, 0.625, 0.3125 y 0.15625mg/mL de lípidos. Se utilizó solución salina como blanco.

La cantidad de lípidos totales se calculó con la siguiente relación:

$$\text{Concentración de lípidos en hemolinfa (mg/mL)} = (\text{Abs} \times \text{FD}) / (m * 100) \quad (6)$$

$$\text{Concentración de lípidos en tejidos (mg/gr)} = (\text{Abs} \times \text{FD}) / (m \times \text{Peso de la muestra}) \quad (7)$$

donde: Abs es la absorbancia obtenida de cada muestra, m es la pendiente en la curva estandar y FD es el factor de dilución.

6.4.5. Determinación de triglicéridos.

En la determinación de triglicéridos se utilizó una prueba enzimática colorimétrica (kit de RANDOX, No. catalogo TR 1697). Esta prueba determina la concentración de triglicéridos a partir de la hidrólisis enzimática con lipasas. El indicador es una quinonemina formada por peróxido de hidrógeno, 4-aminofenazona y 4-clorofenol, bajo la influencia de una peroxidasa (Fig. 13). Esta técnica ha sido adaptada para su uso en una microplaca de 96 pozos en el laboratorio de bioquímica fisiológica del CIBNOR.

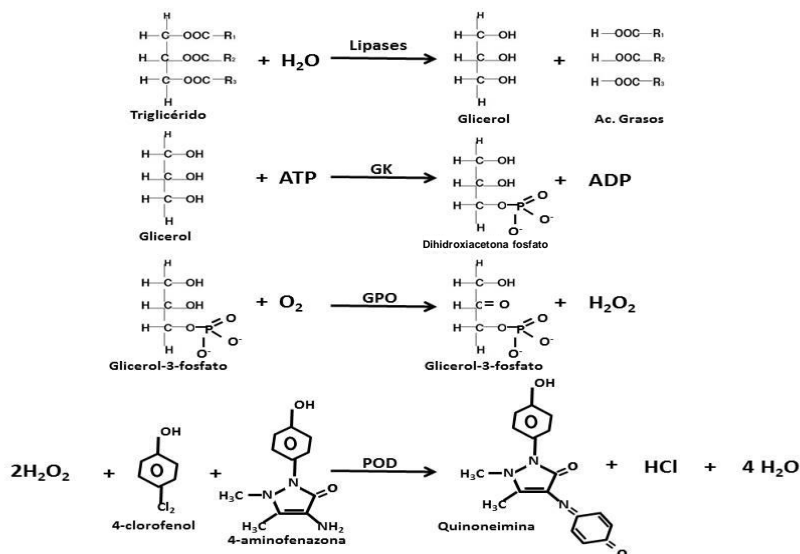


Figura 13. Principio enzimático para la determinación de triglicéridos. GK: glicerol kinasa; GPO: glicerol fosfato oxidasa; POD: peroxidasa (adaptado de Fosatti y Prencipe, 1982).

Para la prueba se tomó una alícuota de hemolinfa u homogenizado de $20\mu L$ y se colocó en el fondo de una microplaca, se le agregaron $200\mu L$ de solución reactiva y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente la placa se leyó en un espectrofotómetro de microplacas (Termo, Multiskan spectrum, Vantaa-Finlandia) a una absorbancia de 540 nm.

La curva de calibración se realizó con una solución estándar que contiene 200mg/dL de triglicéridos, de ésta solución se prepararon diluciones en proporción 1:2, en 1mL de agua destilada, quedando concentraciones de 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.125 mg/dL de triglicéridos. Se utilizó agua destilada como blanco.

La cantidad de triglicéridos se calculó mediante las siguientes formulas:

$$\text{Concentración de triglicéridos en hemolinfa (mg/mL)} = (\text{Abs} \times \text{FD}) / (m \cdot 100) \quad (8)$$

$$\text{Concentración de triglicéridos en tejidos (mg/g)} = (\text{Abs} \times \text{FD}) / (m \cdot 100 \cdot \text{peso de la muestra}) \quad (9)$$

donde: Abs es la absorbancia obtenida de cada muestra, m es la pendiente en la curva tipo y FD es el factor de dilución.

6.4.6. Determinación de glucosa en hemolinfa.

Para medir la concentración de glucosa en las muestras de hemolinfa se utilizó una prueba enzimática colorimétrica (kit de RANDOX método GOD-PAP, No. catalogo AY 891). El método se basa en la oxidación de la glucosa por medio de la enzima glucosa oxidasa, provocando la formación de peróxido de hidrógeno, que a su vez reacciona, catalizado por una peroxidasa, con fenol y 4-aminofenazona para formar quinoneimina, un indicador rojo-violeta, cuya intensidad es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra (Fig. 14). Esta técnica fue adaptada y estandarizada para su uso en microplaca en el laboratorio de bioquímica fisiológica del CIBNOR.

Se tomó una alícuota de cada muestra de hemolinfa de 20µL y se puso en el fondo de una microplaca, se le agregaron 200µL de solución reactiva y se incubó por un tiempo de 20 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación se leyó la placa en un espectrofotómetro de microplacas (Termo, Multiskan spectrum, Vantaa-Finlandia) a una absorbancia de 540 nm.

Para determinar la concentración de glucosa en las muestras de hemolinfa fue necesario realizar una curva estándar partiendo de una solución estándar de glucosa que contiene 100mg/dL, de ésta se prepararon diluciones en proporción 1:2, en 1mL de agua destilada, quedando concentraciones de 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125 y 0.015625 mg/mL de glucosa. Se utilizó agua destilada como blanco.

La cantidad de glucosa fue calculada con la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de glucosa en hemolinfa (mg/mL)} = (\text{Abs} \times \text{FD}) / (\text{m} \times 100) \quad (10)$$

donde: Abs es la absorbancia obtenida de cada muestra, m es la pendiente de la curva estándar y FD es el factor de dilución.

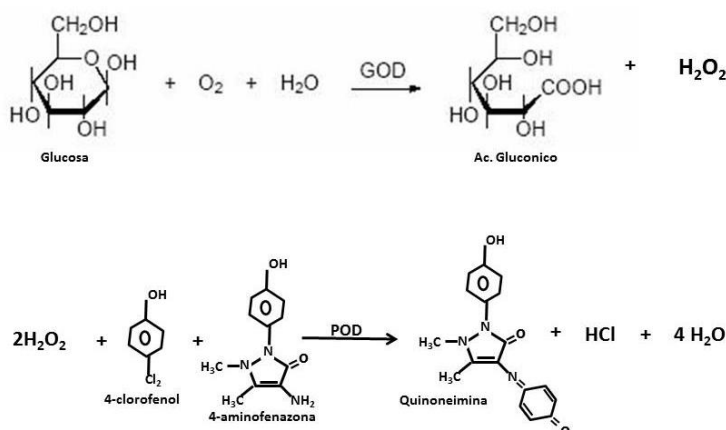


Figura 14. Principio enzimático de la determinación de glucosa. GOD: glucosa oxidasa; POD: peroxidasa (adaptado de Barham y Trinder, 1972).

6.4.7. Análisis estadísticos.

Para estimar las diferencias en reservas bioquímicas entre las hembras que se identificaron en diferentes estadios de vitelogenénesis, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía en el cual el factor o variable independiente fue la clasificación de estadios y sub-estadios asignados y las variables dependientes fueron los diferentes componentes bioquímicos obtenidos en cada uno de los diferentes tejidos de cada hembra: gónada (Proteínas totales, Lípidos totales, Triglicéridos, Carbohidratos totales), hepatopáncreas (Proteínas totales, Lípidos totales, Triglicéridos, Carbohidratos totales) y hemolinfa (Glucosa y Triglicéridos). Este análisis se realizó en base a la metodología propuesta por Arcos *et al.* (2011).

Antes de realizar los análisis estadísticos, se utilizó la prueba Kolmogorov-Smirnov para corroborar la normalidad de todas las mediciones bioquímicas realizadas de cada una de las hembras. Con los datos obtenidos se realizaron transformaciones para normalizarlos, empleando el \log_{10} y realizar los análisis estadísticos de ANOVA (Zar, 1999). En los casos donde se obtuvieron diferencias significativas ($P < 0.5$) se realizó una prueba de comparación de medias de Tukey (Zar, 1999).

Adicionalmente se realizaron análisis de correlación lineal simple de Pearson (r , Snedecor y Cochran, 1989) entre las siguientes variables: Componentes bioquímicos en gónada, hepatopáncreas y hemolinfa y las variables asociadas con grado de madurez gonádica (área total y diámetro teórico de los ovocitos).

Todos los análisis estadísticos fueron realizados al 95% de confianza. Todos los análisis fueron realizados usando el módulo GLM del programa de computo STATISTICA, versión 10.

6.5. Metodología para la caracterización molecular de la vitelogenénesis.

6.5.1. Aislamiento del transcrito de vitelina de gónada y hepatopáncreas.

6.5.1.1. Diseño de cebadores para la amplificación del transcrito de vitelina.

A partir de secuencias de vitelinas de otros crustáceos decápodos (Tabla III) obtenidas del GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), se diseñaron cebadores degenerados para la amplificación del transcrito del gen de vitelina (mRNA-*Vtg*) de centolla. Las secuencias obtenidas fueron alineadas utilizando diferentes programas bioinformáticos como MEGA 6, BioEdit v7.2.5 (Hall, 1999) y el programa en línea ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

Tabla III. Secuencias utilizadas en el diseño de los cebadores.

Espece	# de Accesoión	Tamaño (pb)
<i>Portunus trituberculatus</i>	DQ000638.1	7846
<i>Eriocheir sinensis</i>	KC699915.1	7921
<i>Charybdis feriatus</i>	AY724676.1	8032
<i>Scylla paramamosain</i>	KC734559.1	7809
<i>Callinectes sapidus</i>	JF719908.1	7881
<i>Callinectes sapidus</i>	DQ314748.1	7833

Pb.- Pares de bases

Las secuencias alineadas fueron analizadas y se determinaron las regiones más conservadas de las mismas obteniendo una secuencia consenso, a partir de las cuales se diseñaron los cebadores tomando en cuenta las siguientes consideraciones: un tamaño de 18-21 pares de bases, un porcentaje de G+C entre 40-60%, Tm entre 50-70°C, terminaciones en G o C, CG y GC. Se evitó que los extremos 3' de los primers fueran complementarios por la formación de dímeros además de evitar la autocomplementariedad, impidiendo la capacidad de formar estructuras tales como horquillas. Se diseñaron un total de 6 pares de cebadores que generan productos de diferentes tamaños (Tabla IV) y ubicados en diferentes secciones de la secuencia consenso (anexo II).

Tabla IV. Cebadores inespecíficos diseñados para transcrito de vitelina.

Cebadores	Tamaño (Pb)	ND*	Tm(°C)	Tm _{Prom} (°C)	%GC	PE (pb)
5'-TGGTGAGYGYGGDGCCAYCAT -3' F	21	4	68.7	66.05	52.4	1237
5'-AGGGCGAGGCACGAGGTARAA-3' R	21	1	63.4		57.1	
5'-AAGAAGGAGAAGAACCAYCG-3' F	20	1	59.6	60.6	45.0	1458
5'-GGGARTACCGTTCCATC -3' R	18	1	61.6		55.6	
5'-TGCAGTCATCCCGAYGACGA-3' F	20	1	72.8	72.3	55	1076
5'-CCCATGTTGCCAAGGCTYTTGA-3' R	22	1	71.8		50	
5'-TCAAGATGAACRCCACYGT-3' F	19	2	58.2	59.5	42.1	1755
5'-TTCCAGAGCACCATCATCT-3' R	19	0	60.9		47.4	
5'-AGATGATGGTGCTCTGGAA-3' F	19	0	60.9	58.3	47.4	1091
5'-GARCCRGTGATYTTGTCAGC-3' R	20	3	55.8		45	
5'-AACAAAYACRRTCSYCATCGAGGC -3' F	23	4	69.7	68.1	43.5	1590
5'-TGAGCGAGGCATGCGNAGNAGAAC-3' R	24	2	66.5		54.2	

Pb.- Pares de bases; ND*.- Número de degeneraciones; Tm.- Temperatura media de alineación; PE.- Producto esperado

*Corresponde al número de bases que no están conservadas dentro de las secuencias alineadas

6.5.1.2. Extracción de ARN total y síntesis de ADNc para la amplificación parcial del transcrito de vitelina.

Para el aislamiento del transcrito de vitelina se realizó la extracción de ARN total a partir de ~100mg de tejido de muestras de gónada y hepatopáncreas mediante el protocolo Tripure Isolation Reagent (Roche Applied Science) (40% fenol, 24% guanidina de tiocinato) (Anexo III-A). La integridad, pureza y concentración del ARN total se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y mediante la relación 260/280 y 260/230 obtenidas a través de un espectrofotómetro (Thermo Scientific NanoDrop 1000).

Las muestras de ARN total fueron tratadas con DNAsa para eliminar los residuos de ADN genómico, para lo cual se utilizó el kit comercial DNAsa I Amplification Grade de Invitrogen siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor (Anexo III-B). Una vez realizado el tratamiento con DNAsa se realizó la amplificación por PCR convencional del gen Ubiquitina para verificar la completa eliminación del ADN genómico, bajo las siguientes condiciones: 1 U de GoTaq Flexi DNA Polymerasa (Promega), 1X Colorless GoTaqR Flexi Buffer, 0.2 mM de dNTPs, 3 mM de MgCl₂, 0.2 μM de cebadores Ubiquitina F (5'-CTG TGG TCT GGT TGG TGT TG-3') y Ubiquitina R (5'-TCG GAT GAG TTC TTG GGT TC-3') (combinación que genera un producto de 191pb) y 0.5μL de RNA total, con un volumen final de reacción de 12.5μL.

La amplificación se realizó en un termociclador Veriti® (Applied Biosystem) utilizando el siguiente programa: 94 °C por 3 min, seguida de 30s a 94 °C, 30s a 58 °C, 30s a 72 °C (desnaturalización/alineación/extensión) por 35 ciclos, y una extensión final de 5 min a 72 °C.

Una vez realizada la amplificación se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TBE 1X durante 30 min a 100 v, utilizando Gel Green y 1 Kb Plus DNA Ladder-Thermo Fisher Scientific, como teñidor y marcador de peso molecular respectivamente y los productos fueron visualizados en un fotodocumentador con

UV (BioDoc-It Imaging System, UVP). En los casos donde se observó amplificación se repitió el tratamiento con DNAsa.

La síntesis de ADNc para la amplificación de los transcritos se realizó utilizando el kit comercial ImProm-II™ Reverse Transcription System de Promega siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor (Anexo III-C). El ADNc obtenido fue almacenado a -20°C hasta su posterior uso. Para verificar la integridad del ADNc se utilizó PCR punto final, utilizando el gen de Ubiquitina como se describió anteriormente.

6.5.1.3. Obtención de los transcritos.

La amplificación de los transcritos se realizó utilizando los cebadores previamente diseñados (descritos en la sección 6.5.1.1; Tabla IV). Para la estandarización de la amplificación de cada par de cebadores se realizaron diferentes gradientes de temperaturas y concentraciones de MgCl₂. Las amplificaciones se realizaron utilizando 0.2 U de GoTaq Flexi DNA Polymerasa (Promega), 1X Colorless GoTaq Flexi Buffer, 0.2 mM de dNTP's, 2, 3 ó 4 mM de MgCl₂, 0.2 μM de cada par de cebadores (Forward y Reverse) y 0.5 μL de ADNc, en un volumen final de reacción de 12.5 μL. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Veriti® (Applied Biosystem) utilizando el siguiente programa: 95 °C por 3 min, seguida de 30s a 94 °C, 30s a una $T_{m_{prom}}$ (Tabla IV) \pm 1 °C y 2 min a 72 °C (desnaturalización/alineación/extensión) por 35 ciclos, y una extensión final de 15 min a 72 °C. Los productos de amplificación se corrieron en una electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TBE 1X durante 45 min a 100 v, utilizando Gel Green y 1 Kb Plus DNA Ladder-Thermo (Fisher Scientific) como teñidor y marcador de peso molecular respectivamente y fueron visualizados en un fotodocumentador con UV (BioDoc-It Imaging System, UVP).

En los casos donde se obtuvieron fragmentos potencialmente esperados y/o mayores a los 500 pb, las bandas fueron cortadas del gel de agarosa y puestas a eluir en agua libre de nucleasas durante toda la noche. Los productos eluidos

fueron reamplificados utilizando las condiciones correspondientes a cada uno y posteriormente se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa la presencia de cada transcrito.

6.5.1.4. Clonación y secuenciación de los transcritos obtenidos.

Los transcritos obtenidos fueron ligados al vector plasmídico *pGEM- T Easy* vector systems (Promega) (Anexo III-D) y con él se transformaron bacterias competentes *E. coli* DH5 α (Invitrogen) (Anexo III-E) para su clonación, las bacterias se dejaron crecer durante ~18 h en medio LB-Agar con ampicilina. Las colonias aparentemente transformadas fueron levantadas (Anexo III-F) y de cada colonia levantada se realizó un PCR colony (anexo III-G) utilizando los cebadores M13 (Forward: 5'-GTAAAACGACGACGGCCAG-3'; Reverse: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). Los productos de amplificación se corrieron en una electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TBE 1X durante 45 min a 100 v, utilizando Gel Green y 1 Kb Plus DNA Ladder-Thermo (Fisher Scientific) como teñidor y marcador molecular respectivamente y fueron visualizados en un fotodocumentador con UV (BioDoc-It Imaging System, UVP).

En las colonias donde se obtuvo un producto de amplificación mayor a 700 pb se realizó una reamplificación utilizando el par de cebadores M13 para aumentar la concentración de los transcritos para su posterior secuenciación. Los productos obtenidos fueron enviados a MACROGEN (Corp. Korea) para su secuenciación en ambos sentidos (5'-3' y 3'-5'). Las secuencias fueron editadas utilizando el programa BioEdit v7.2.5 (Hall, 1999) y se analizó su similitud y analogía mediante el programa en línea BLAST con otras secuencias nucleotídicas y de aminoácidos en la base de datos del Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

7. RESULTADOS

7.1. Caracterización morfohistológica e histoquímica de la ovogénesis y vitelogénesis de hembras del crustáceo subantártico centolla (*L. santolla*).

7.1.1. Caracterización morfohistológica.

Con la caracterización morfohistológica de la ovogénesis se identificaron cinco estadios de desarrollo gonadal, Estadio 0: Multiplicación; Estadio I: previtelogénico; Estadio II: vitelogénesis; Estadio III: Madurez y Estadio IV: Desove (Fig. 15), los cuales fueron establecidos de acuerdo con las clasificaciones realizadas para otros decápodos como el camarón *Penaeus japonicus* (Yano, 1988), la langosta *Panulirus japonicus* (Minagawa y Sano, 1997) y el cangrejo araña *Maiopsis panamensis* (López-Martínez, Sometido) (Tabla V). La descripción de cada estadio del desarrollo gonadal que se identificó en *L. santolla* se describe detalladamente en la tabla VI.

La validación de estos estadios se realizó mediante un ANOVA de una vía en la cual se obtuvieron diferencias significativas para cada uno de los diferentes estadios descritos (Tabla VII). Dentro del estadio de vitelogénesis se establecieron dos sub-estadios, vitelogénesis primaria y vitelogénesis secundaria los cuales también mostraron diferencia significativa en el tamaño de los ovocitos que los caracterizan (Tabla VII).

Dentro de cada estadio se caracterizaron y validaron 9 tipos diferentes de ovocitos los cuales presentaron claras diferencias significativas en su tamaño a excepción de los ovocitos con migración de vesícula germinal clasificados en el estadio de madurez y los ovocitos con rompimiento de la vesícula germinal clasificados en el estadio de desove, los cuales no presentaron diferencias significativas entre sus tamaños (Tabla VIII).

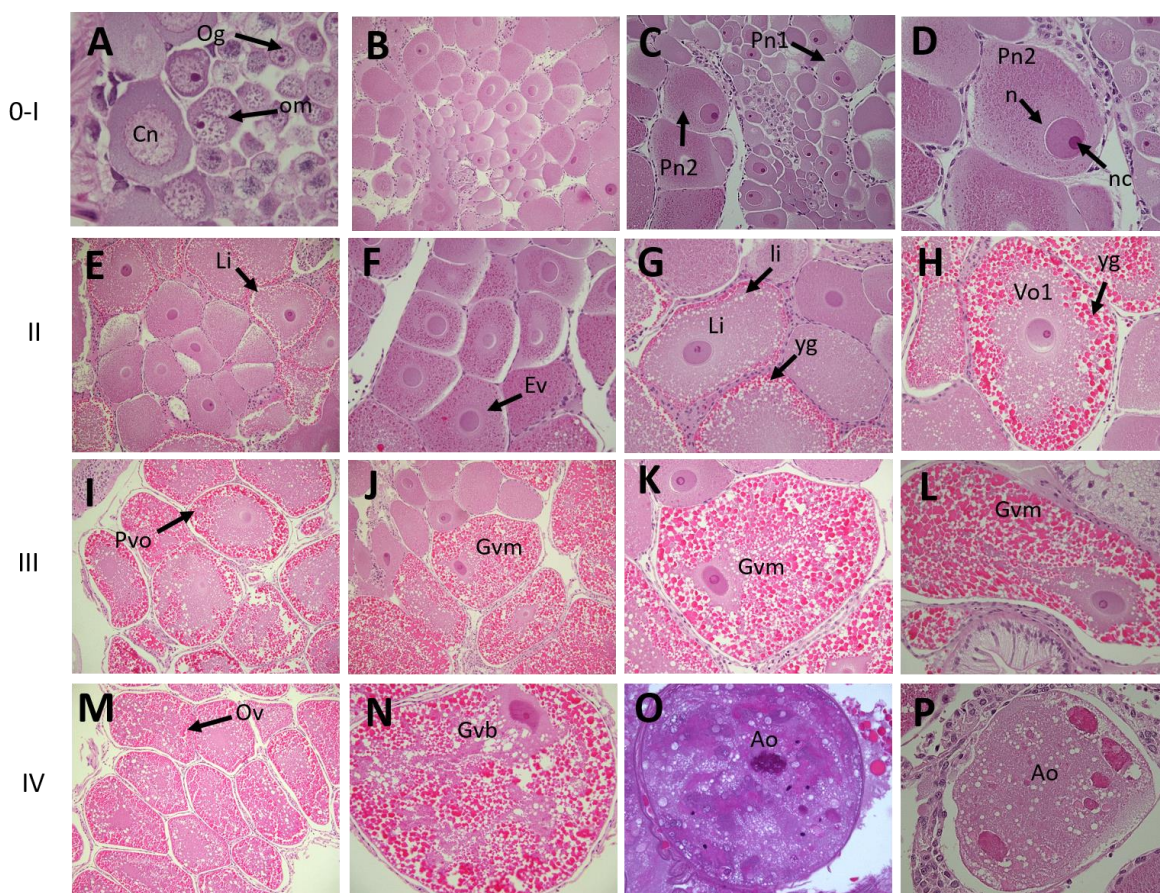


Figura 15. Micrografía del desarrollo ovárico (ovogénesis) de las hembras de centolla (*L. santolla*). A) Ovario en Estadio 0 (Multiplicación) con ovogonias en multiplicación (Og); ovogonias en mitosis (Om); ovocitos en nucléolo cromatina (Cn). B, C, D) Ovario en Estadio I (Previtelogénesis) con ovocitos perinucleolo temprano (Pn1), y perinucleolo tardío (Pn2). E, F, G, H); Ovario en Estadio II (Vitelogénesis) con ovocitos en subestadio de vitelogenesis temprana (Ev) y glóbulo de aceite (Li) (fase primaria de vitelogénesis) y ovocitos en subestadio granulo de vitelo (yg), ovocitos en subestadio glóbulo de vitelo temprano (Vo1) (fase secundaria de vitelogénesis). I, J, K, L) Ovario en Estadio III (Madurez) con ovocitos postvitelogénicos (Pvo) y ovocitos con migración de vesicular germinal (Gvm). M, N, O, P) Ovario en Estadio IV (Desove) con ovocitos con rompimiento de vesicular germinal (Gvb), Ovulos (Ov) y ovocitos en atresia (Ao); fc = células foliculares; fl = folículo; Li= glóbulo de aceite; n = núcleo; nc = nucléolo; yg = gránulos de vitelo.

Tabla V. Clasificación de los estadios de desarrollo ovárico identificados en las hembras de centolla (*L. santolla*), con base en las clasificaciones establecidas para *Penaeus japonicus* (Yano, 1988), *Panulirus japonicus* (Minagawa y Sano, 1997) y *Maiopsis panamensis* (López-Martínez, Sometido).

Estadios de desarrollo ovárico	Clasificación de los estadios de desarrollo ovárico			
	<i>Lithodes santolla</i>	<i>Penaeus japonicus</i>	<i>Panulirus japonicus</i>	<i>Maiopsis panamensis</i>
Estadio 0: "Multiplicación"	<ul style="list-style-type: none"> • Multiplicación -Ovogonia en multiplicación -Ovogonia en mitosis 	- Ovogonia	<ul style="list-style-type: none"> • Ovogénesis -Ovogonia -Ovocito tempranos 	- Ovogonia
Estadio I: Pre-Vitelogénesis	<ul style="list-style-type: none"> • Previtelogénesis -Ovocito nucléolo cromatina -Ovocito perinucleolo temprano -Ovocito perinucleolo tardío 	<ul style="list-style-type: none"> -Ovocito nucléolo cromatina -Perinucleolo cromatina temprano -Perinucleolo cromatina tardío 	<ul style="list-style-type: none"> • Previtelogénesis - Ovocito primarios 	-Ovocito nucléolo cromatina temprano
Estadio II: Vitelogénesis	<ul style="list-style-type: none"> • Vitelogénesis • V. Primaria -Ovocito glóbulo de aceite -Ovocito glóbulo de vitelo temprano • V. Secundaria -Ovocito glóbulo de vitelo tardío 	<ul style="list-style-type: none"> • Vitelogénesis primaria -Ovocito glóbulo lipídico I -Ovocito glóbulo lipídico II • Vitelogénesis secundaria -Ovocito gránulo de vitelo -Premaduración 	<ul style="list-style-type: none"> • Vitelogénesis -Ovocitos primarios tipo 2 -Ovocito primarios tipo 3 	<ul style="list-style-type: none"> -Ovocito nucléolo cromatina tardío -Ovocito glóbulo lipídico -Ovocito glóbulo de vitelo temprano
Estadio III: Madurez	<ul style="list-style-type: none"> • Maduración -Ovocito Postvitelogenico -Ovocito con migración de la vesícula germinal 	<ul style="list-style-type: none"> • Maduración (ovulación) 	<ul style="list-style-type: none"> • Maduración - Ovocitos tipo 4 	- Ovocito glóbulo de vitelo tardío
Estadio IV: Desove	- Ovocito con rompimiento de la vesícula germinal	- Ovocito con rompimiento de la vesícula germinal	*	-Ovocito con migración de la vesícula germinal

(•= estadio, - = subestadios,*= subestadio no descrito). Adaptada de López-Martínez (Sometido).

Tabla VI. Descripción morfo-histológica de los estadios de desarrollo ovárico identificados en las hembras adultas del crustáceo subantártico centolla (*L. santolla*).

Estadios de desarrollo ovárico	Características
Estadio 0: Multiplicación	Solo se encuentran ovogónias (Og) en multiplicación mitótica (Og;Om)
Estadio I: Pre-Vitelogénesis	En este estadio se observan ovogónias y tres sub-estadios de ovocitos previtelogénicos de manera simultánea: nucléolo cromatina, perinucleolo temprano (Pn1) y perinucleolo tardío (Pn2). En esta especie se observa un solo y gran nucléolo ubicado excéntricamente en la periferia del nucleoplasma. Las células foliculares rodean a los ovocitos perinucleolo tardío; a partir de este sub-estadio cada ovocito es sostenido y nutrido por su propio folículo.
Vitelogénesis primaria	
Estadio II: Vitelogénesis	Este estadio presenta un traslape en las etapas de previtelogénesis y vitelogénesis, encontrándose hasta cinco sub-estadios de ovocitos simultáneamente, ovocitos vitelo temprano (Ov1) los que caracterizan este estadio, son de forma ovoide y comienzan a formar pequeñas inclusiones lipídicas y pequeños gránulos ligeramente acidófilos de tamaño relativamente uniformes acumulados en la periferia del ovoplasma, debajo de la membrana vitelina. Simultáneamente se observan ovocitos más grandes con mayor cantidad de glóbulos de vitelo en la periferia del ovoplasma, las células foliculares se vuelven más planas.
Vitelogénesis secundaria	
	Los ovocitos glóbulo de vitelo tardío (Ov2) son más numerosos y de diferentes tamaños. El arreglo del nucléolo y de las células foliculares es similar al subestadio previo (Ov1). Las ovogónias y ovocitos previtelogénicos aún están presentes en este estadio.
Estadio III: Madurez (Pos-tvitelogenesis)	Los ovocitos post-vitelogénicos (Pvo) alcanzan el crecimiento máximo del ovoplasma. Los gránulos de vitelo adquieren también su tamaño máximo y el ovocito está completamente lleno de estos. Los gránulos de vitelo son de carácter acidófilo ricos en triglicéridos. Las células foliculares son más planas, mientras que se sigue observando un solo nucléolo, grande y redondo.
Estadio IV	Los ovocitos alcanzan el tamaño máximo del diámetro teórico, el núcleo comienza a perder su forma redonda. El estadio de rompimiento de la vesícula germinal o RVG marca el final del proceso de vitelogénesis. No hay células foliculares rodeando a los ovocitos debido a que el folículo se rompe y son liberados para dirigirse al oviducto. Ocurre una migración del núcleo, para el reinicio de la meiosis y a la formación del uso acromático. Se observan ovocitos atresicos indicando el desove e inicio de la etapa de reabsorción en el cual se degrada el vitelo. Los óvulos pueden observarse en el lumen del oviducto.
Desove/Reabsorción	

Tabla VII. Análisis de varianza (ANOVA) de una vía realizado para las variables morfo-histológica cuantitativas obtenidas de los estadios de desarrollo ovárico identificados en las hembras de centolla (*L. santolla*). Se presentan los valores promedio \pm error estándar.

Estadios de desarrollo ovárico	Sub-estadio	Diámetro teórico (μm)	ANOVA
Estadio 0: Multiplicación		43.67 ± 2.04^a	$P < 0.01$
Estadio I: Pre-Vitelogénesis		117.18 ± 2.53^b	$P < 0.01$
Estadio II: Vitelogénesis	Primaria	210.44 ± 2.87^c	$P < 0.01$
	Secundaria	318.22 ± 3.79^d	$P < 0.01$
Estadio III: Madurez		507.98 ± 6.24^e	$P < 0.01$
Estadio IV: Desove		610.32 ± 49.77^f	$P < 0.01$

Las letras superíndices indican diferencias significativas después de la prueba de medias de Tukey ($P < 0.05$).

Tabla VIII. Análisis de varianza (ANOVA) de una vía realizado para las variables morfo-histológica obtenidas de los diferentes tipos de ovocitos pertenecientes a los estadios de desarrollo ovárico, identificados en las hembras de centolla (*L. santolla*). Se presentan los valores promedio \pm error estándar.

Estadios de desarrollo ovárico y tipos de ovocitos	Diámetro teórico (μm)	ANOVA
Estadio 0. Multiplicación:		
-Ovogonia en multiplicación	23.45 \pm 1.42 ^a	$P < 0.01$
-Ovocito nucléolo cromatina	51.56 \pm 1.52 ^b	$P < 0.01$
Estadio I. Pre-Vitelogénesis:		
-Ovocito perinucleolo temprano	79.25 \pm 1.17 ^c	$P < 0.01$
-Ovocito perinucleolo tardío	126.34 \pm 2.38 ^d	$P < 0.01$
Estadio II. Vitelogénesis:		
-Ovocito glóbulo de aceite	183.32 \pm 1.98 ^e	$P < 0.01$
-Ovocito glóbulo de vitelo temprano	229.74 \pm 2.64 ^f	$P < 0.01$
-Ovocito glóbulo de vitelo tardío	318.22 \pm 3.79 ^g	$P < 0.01$
Estadio III. Madurez:		
-Ovocito post-vitelogénicos	462.83 \pm 6.58 ^h	$P < 0.01$
-Ovocito con migración vesícula germinal	569.17 \pm 7.15 ⁱ	$P < 0.01$
Estadio IV. Desove:		
-Ovocito con rompimiento de la vesícula germinal	610.32 \pm 49.77 ⁱ	$P < 0.01$

Las letras superíndices indican diferencias significativas después de la prueba de medias de Tukey ($P < 0.05$).

7.1.2. Caracterización histoquímica.

En la caracterización histoquímica se observaron los patrones de acumulación de triglicéridos y fosfolípidos. En la figura 16 se puede apreciar el contenido de cada tipo de lípido en los distintos ovocitos caracterizados, observando que los ovocitos previtelogénicos (nucléolo cromatina y perinucleolo temprano y tardío) están caracterizados por una mayor acumulación de fosfolípidos en su interior que de triglicéridos. Los ovocitos en fase vitelogénica primaria solo presentan la acumulación de gotas de lípidos mientras que en la fase secundaria se puede apreciar un ovocito que además de gotas lipídicas presenta una acumulación de gránulos de vitelo ubicadas hacia la periferia del ovoplasma. La fase de madurez está caracterizada por ovocitos que presentan una gran acumulación de triglicéridos en casi todo el ovoplasma, observándose una cantidad menor de fosfolípidos hacia el interior de la célula. Por último en los ovocitos de la fase de desove ya no se aprecia la presencia de fosfolípidos en el ovoplasma observándose únicamente una gran cantidad de triglicéridos.

Los resultados histoquímicos cuantitativos (Tablas IX y X) muestran que la cantidad de triglicéridos aumenta conforme avanza el desarrollo de los ovocitos encontrando la mayor concentración en el ovocito glóbulo de vitelo tardío (34.84 %) la cual en el resto del desarrollo ya no mostro una diferencia estadísticamente significativa. Las ovocitos previtelogénicos mostraron la mayor concentración de fosfolípidos, principalmente el ovocito perinucleolo temprano (81.34%), posteriormente conforme avanza el desarrollo de los ovocitos la concentración de fosfolípidos disminuye siendo los ovocitos de la etapa de madurez y desove los que menor concentración de fosfolípidos tuvieron lo cual concuerda con los datos cualitativos observados en la figura 16.

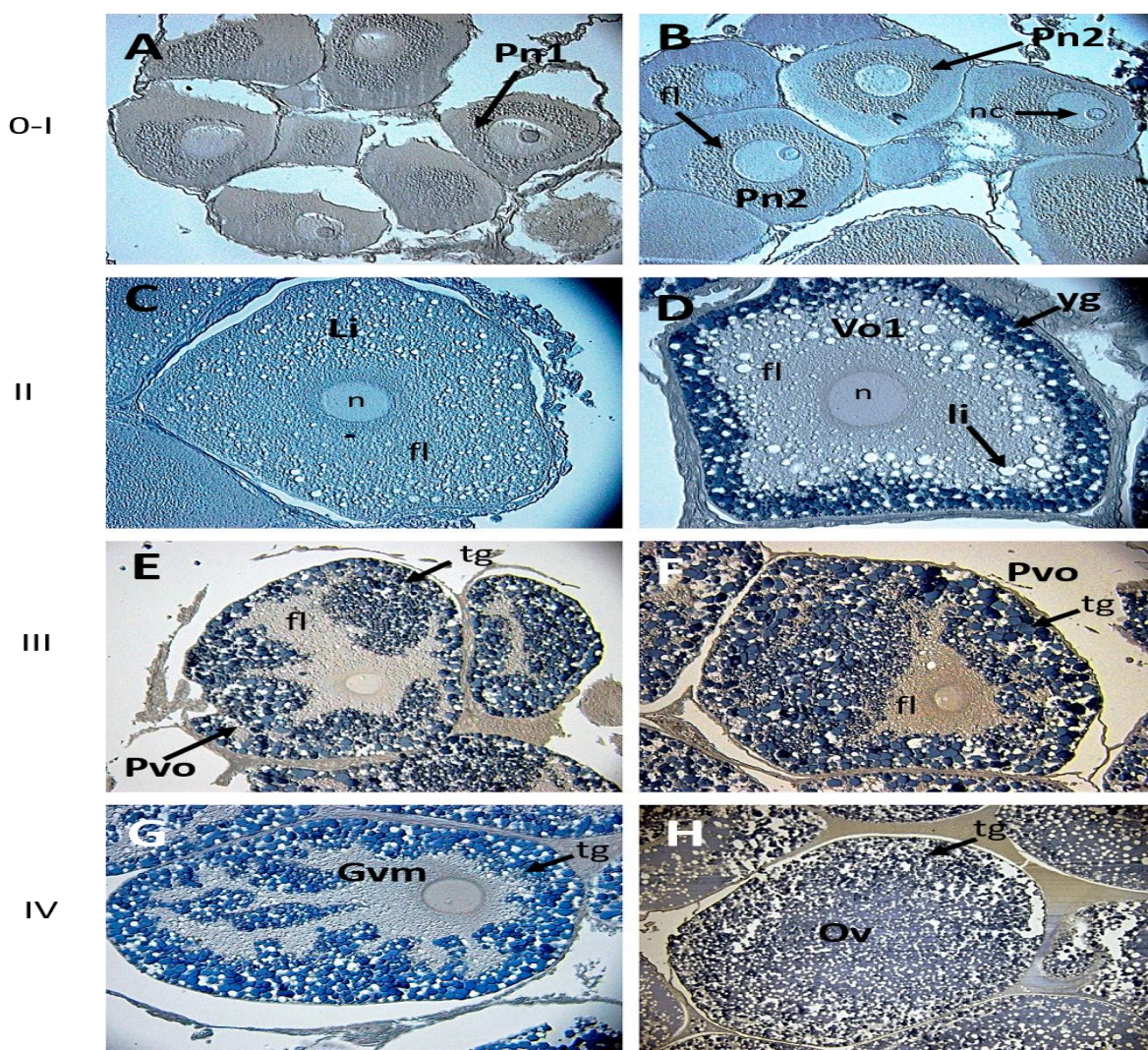


Figura 156. Micrografía con la caracterización histoquímica de lípidos del desarrollo ovárico (ovogénesis) de las hembras de centolla (*L. santolla*). A y B) Ovario en Estadio I (Previtelogénesis) con ovocitos en perinucleolo temprano (Pn1) y perinucleolo tardío (Pn2); C y D) Ovario en Estadio II (Vitelogénesis) con ovocitos en subestadio de glóbulo de aceite (Li) (fase primaria de vitelogénesis) y ovocitos en subestadio glóbulo de vitelo temprano (Vo1) (fase secundaria de vitelogénesis); E y F) Ovario en Estadio III (Madurez) con ovocitos postvitelogénicos (Pvo); G y H) Ovario en Estadio IV (Desova) ovocitos con migración de vesicular germinal (Gvm), óvulos (Ov) li = glóbulo de aceite; n = núcleo; nc = nucléolo; yg = gránulos de vitelo. Tinción Sudan Negro.

Tabla IX. Análisis de varianza (ANOVA) de una vía realizado para las variables morfo-histológica e histoquímica cuantitativas obtenidas de los estadios de desarrollo ovárico identificados en las hembras de centolla (*L. santolla*). Se presentan los valores promedio \pm error estándar.

Estadios de desarrollo ovárico	Variables Histoquímicas		
	Fase	Índice de triglicéridos (%)	Índice de fosfolípidos (%)
Estadio 0: Multiplicación		7.79 \pm 0.61 ^a	56.07 \pm 4.41 ^a
Estadio I: Pre-Vitelogénesis		17.55 \pm 3.0 ^b	71.83 \pm 3.88 ^b
Estadio II: Vitelogénesis	Primaria	24.50 \pm 2.80 ^c	27.56 \pm 3.10 ^c
	Secundaria	30.82 \pm 3.09 ^d	31.51 \pm 3.58 ^c
Estadio III: Madurez		34.66 \pm 3.19 ^d	24.43 \pm 3.75 ^d
Estadio IV: Desove		33.20 \pm 5.19 ^d	23.02 \pm 3.01 ^d

Las letras superíndices indican diferencias significativas después de la prueba de medias de Tukey ($P < 0.05$).

Tabla X. Análisis de varianza (ANOVA) de una vía realizado para las variables histoquímicas obtenidas de los diferentes tipos de ovocitos pertenecientes a los estadios de desarrollo ovárico, identificados en las hembras centolla (*L. santolla*). Se presentan los valores promedio \pm error estándar.

Estadios de desarrollo ovárico y tipos de ovocitos	Variables Histoquímicas	
	Índice de Triglicéridos (%)	Índice de Fosfolípidos (%)
Estadio 0. Multiplicación:		
-Ovogonia en multiplicación	07.79 \pm 0.61 ^a	56.08 \pm 4.41 ^a
-Ovocito nucléolo cromatina	22.84 \pm 1.85 ^b	60.71 \pm 1.43 ^a
Estadio I. Pre-Vitelogénesis:		
-Ovocito perinucleolo temprano	26.97 \pm 0.91 ^c	81.34 \pm 1.82 ^b
-Ovocito perinucleolo tardío	28.99 \pm 1.30 ^c	53.35 \pm 0.87 ^a
Estadio II. Vitelogénesis:		
-Ovocito glóbulo de aceite	30.58 \pm 1.88 ^c	47.14 \pm 1.30 ^c
-Ovocito glóbulo de vitelo temprano	32.58 \pm 0.82 ^c	36.79 \pm 1.07 ^d
-Ovocito glóbulo de vitelo tardío	34.84 \pm 0.53 ^d	27.21 \pm 1.05 ^e
Estadio III. Madurez:		
-Ovocito postvitelogénicos	33.25 \pm 2.19 ^d	23.33 \pm 3.01 ^e
-Ovocito con migración vesícula germinal	30.59 \pm 3.51 ^{c,d}	25.43 \pm 3.7 ^e
Estadio IV. Desove:		
-Ovocito con rompimiento de la vesícula germinal	29.59 \pm 2.51 ^{c,d}	23.43 \pm 3.7 ^e

Las letras superíndices indican diferencias significativas después de la prueba de medias de Tukey ($P < 0.05$).

7.2. Movilización de las reservas energéticas durante la vitelogénesis de hembras de centolla (*L. santolla*).

En la tabla XI se presentan los promedios de las concentraciones de los diferentes componentes bioquímicos (proteínas totales, lípidos totales, triglicéridos, carbohidratos totales y glucosa) determinados en los tejidos de gónada y hepatopáncreas y en la hemolinfa de todas las muestras de hembras de centolla.

Los resultados fueron agrupados en los diferentes estadios determinados y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, para determinar diferencias significativas entre la concentración de los diferentes componentes bioquímicos y cada estadio de desarrollo ovárico.

La concentración de proteínas totales en el ovario mostró un aumento significativo durante las primeras etapas de la ovogénesis, el cual se sostuvo hasta la etapa de madurez. Sin embargo, en las muestras en estadio de desove la concentración de proteínas totales fue similar a la que se calculó para las muestras previtelogénicas, observándose de esta forma una significativa disminución en la concentración de proteínas entre los estadios de madurez y desove (Fig. 17). Por otra parte la concentración de proteínas totales en el hepatopáncreas reflejó un aumento significativo durante los primeros estadios de la ovogénesis alcanzando su máxima concentración durante la vitelogénesis secundaria, posteriormente en los estadios de madurez y desove se observó una disminución significativa con respecto al estadio anterior (Fig. 17). Finalmente, los niveles de proteínas totales en la hemolinfa permanecieron constantes durante las primeras etapas de la ovogénesis. Durante las etapas tardías (vitelogénesis secundaria y madurez) se observó un incremento significativo y al igual que en el ovario en la etapa de desove hubo una disminución significativa de la concentración, incluso por debajo de la obtenida en el estadio de previtelogénesis (Fig. 17).

Los lípidos mostraron un comportamiento similar al de las proteínas. En el ovario se observó un aumento significativo conforme avanzaba el desarrollo de la ovogénesis, pero a diferencia de las proteínas la disminución de la concentración de lípidos en la etapa de desove fue ligera terminando en un nivel incluso superior al observado en la etapa de vitelogénesis secundaria. En el hepatopáncreas los niveles de lípidos aumentaron durante las primeras etapas del desarrollo ovárico y se observó una concentración máxima en la etapa de madurez, esta concentración se mantuvo constante en la etapa de desove (Fig. 18). En hemolinfa no se determinaron los lípidos totales.

Tabla XI. Composición bioquímica de la hemolinfa, hepatopáncreas y ovario de hembras de centolla (*L. santolla*), durante los diferentes estadios de la vitelogénesis. Se presentan los valores promedio \pm error estándar.

Componentes bioquímicos de tejidos de hembras	Estadios y sub-estadios de desarrollo ovárico				
	I	II		III	IV
	Previtelogénesis	Primaria	Secundaria	Madurez	Desove
Hemolinfa:					
PT (mg mL ⁻¹)	116.58 \pm 0.7 ^a	117.04 \pm 1.7 ^a	163.88 \pm 1.7 ^b	173.45 \pm 2.2 ^c	47.82 \pm 6.2 ^d
Tg (mg mL ⁻¹)	0.23 \pm 0.0 ^a	0.34 \pm 0.01 ^b	0.61 \pm 0.0 ^c	0.82 \pm 0.0 ^d	0.95 \pm 0.0 ^e
Gl (mg mL ⁻¹)	0.06 \pm 0.0 ^a	0.07 \pm 0.0 ^a	0.07 \pm 0.0 ^a	0.14 \pm 0.0 ^b	0.20 \pm 0.0 ^c
Hepatopáncreas:					
PT (mg g ⁻¹)	339.06 \pm 8.4 ^a	579.31 \pm 6.8 ^b	674.89 \pm 7.1 ^c	487.07 \pm 8.4 ^d	412.17 \pm 18.6 ^e
LT (mg g ⁻¹)	109.19 \pm 2.2 ^a	135.27 \pm 1.7 ^b	377.65 \pm 2.7 ^c	370.61 \pm 5.5 ^d	365.58 \pm 12.5 ^d
Tg (mg g ⁻¹)	47.40 \pm 0.8 ^a	72.68 \pm 1.1 ^b	92.88 \pm 0.8 ^c	99.91 \pm 0.6 ^c	86.95 \pm 3.6 ^d
CT (mg g ⁻¹)	26.06 \pm 0.7 ^a	27.37 \pm 0.6 ^a	30.82 \pm 1.1 ^b	43.17 \pm 0.4 ^c	40.85 \pm 0.2 ^{b,c}
Ovario:					
PT (mg g ⁻¹)	343.86 \pm 9.0 ^a	560.81 \pm 6.2 ^b	674.89 \pm 7.1 ^c	857.71 \pm 11.1 ^d	363.98 \pm 10.1 ^a
LT (mg g ⁻¹)	153.03 \pm 1.2 ^a	238.11 \pm 6.6 ^b	377.65 \pm 2.7 ^c	561.66 \pm 6.2 ^d	463.86 \pm 1.1 ^e
Tg (mg g ⁻¹)	27.04 \pm 0.5 ^a	35.71 \pm 1.04 ^b	92.88 \pm 0.8 ^c	119.34 \pm 0.7 ^d	118.76 \pm 1.6 ^d
CT (mg g ⁻¹)	19.61 \pm 0.7 ^a	25.46 \pm 0.7 ^b	30.82 \pm 1.1 ^c	21.59 \pm 0.3 ^a	16.78 \pm 0.8 ^a

Las letras superíndices indican diferencias significativas después de la prueba de medias de Tukey ($P < 0.05$). PT: Proteínas totales; LT: Lípidos totales; Tg: Triglicéridos; CT: Carbohidratos totales; Gl: Glucosa.

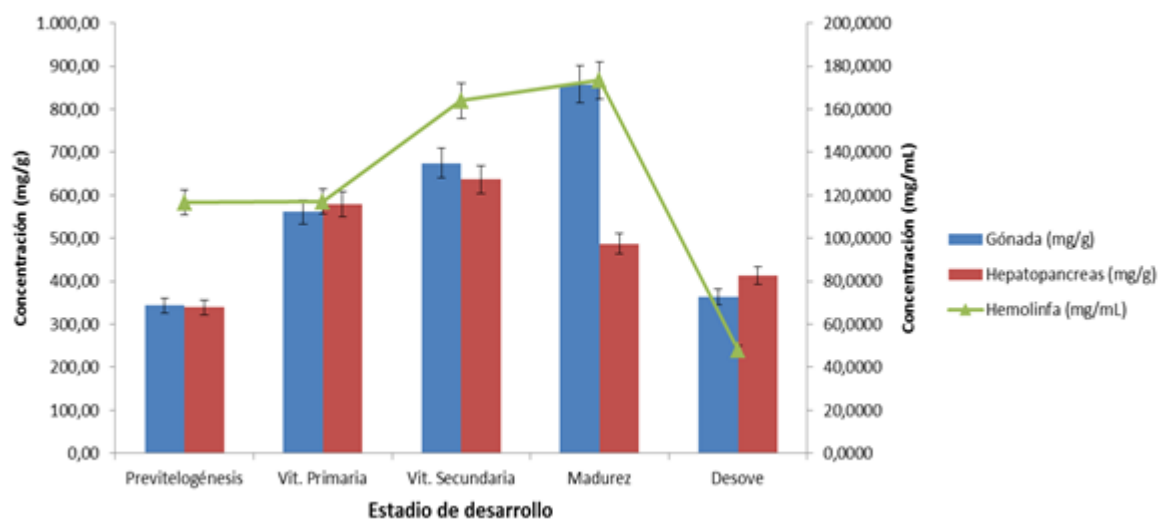


Figura 167. Concentración de proteínas totales durante los diferentes estadios de la ovogénesis de *L. santolla*.

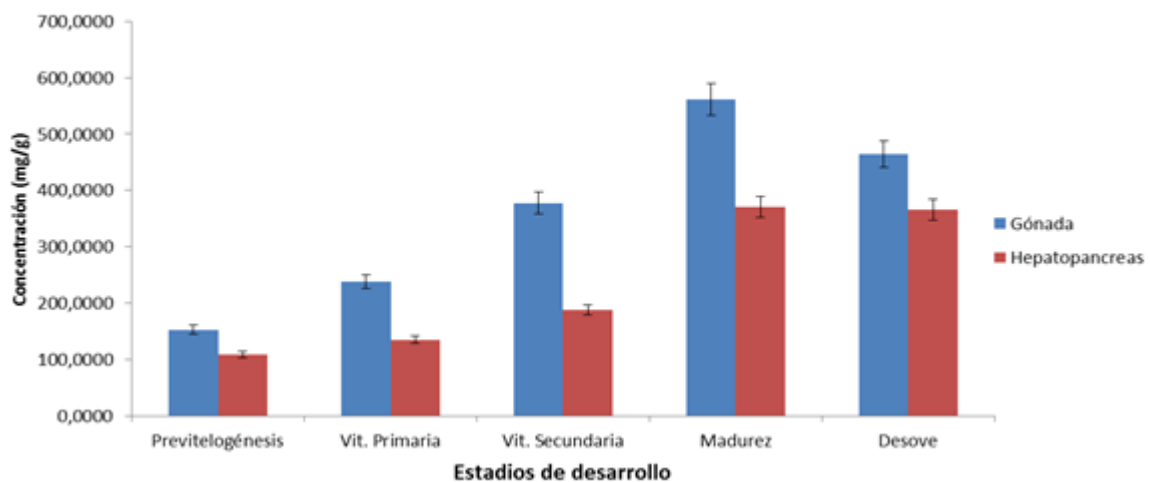


Figura 178. Concentración de lípidos totales durante los diferentes estadios de la ovogénesis de *L. santolla*.

La concentración de triglicéridos en el ovario aumento significativamente durante las primeras etapas de desarrollo ovárico y el aumento se mantuvo hasta la etapa de madurez donde se observó la mayor concentración. Las etapas de madurez y desove no mostraron diferencias significativas en la concentración de triglicéridos y se mantuvieron similares. Por otro lado, en el hepatopáncreas la concentración de triglicéridos aumento significativamente conforme avanzaron las etapas iniciales de la ovogénesis hasta alcanzar su máxima concentración en la etapa de vitelogénesis secundaria (Fig. 19).

En la fase tardía de la ovogénesis no se observó diferencia significativa en la concentración de triglicéridos en el hepatopáncreas, tanto en la vitelogénesis secundaria como en la madurez las concentraciones fueron similares. En la etapa de desove se observó una ligera disminución significativa con respecto a su etapa previa (madurez). Por último en la hemolinfa se observó un aumento significativo de la concentración de triglicéridos conforme avanzaba el desarrollo ovárico, incluso en la fase de desove (Fig. 19).

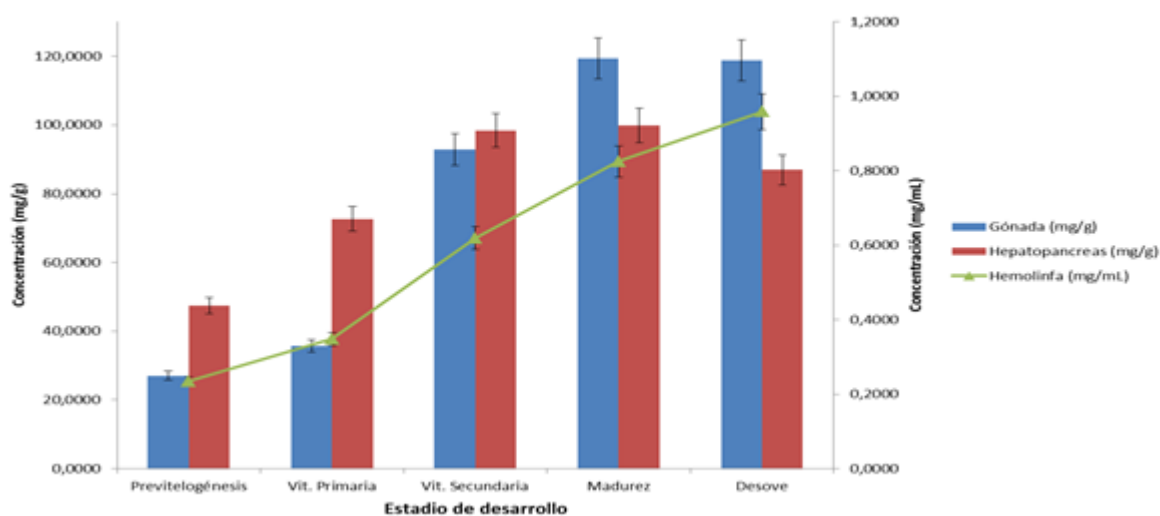


Figura 19. Concentración de triglicéridos durante los diferentes estadios de la ovogénesis de *L. santolla*.

Los carbohidratos totales en el ovario mostraron un incremento significativo en su concentración hasta la etapa de vitelogénesis secundaria, posteriormente, en la etapa de madurez la concentración disminuyó hasta una concentración similar a la de la etapa de previtelogénesis y en la etapa de desove la concentración bajo a un nivel inferior al observado en la etapa de previtelogénesis. En el hepatopáncreas se observaron valores similares en la concentración de carbohidratos totales durante las etapas tempranas de la ovogénesis, incrementando significativamente en la etapa de vitelogénesis secundaria. En las etapas posteriores la concentración de carbohidratos totales no mostró cambios significativos y se mantuvo similar. Por último en la hemolinfa se evaluó la concentración de glucosa en lugar de carbohidratos totales. La concentración de glucosa no mostró un cambio significativo en las tres primeras etapas de la ovogénesis, en la etapa de madurez presentó un aumento significativo con respecto a los estadios anteriores el cual se mantuvo hasta la etapa de desove (Fig. 20).

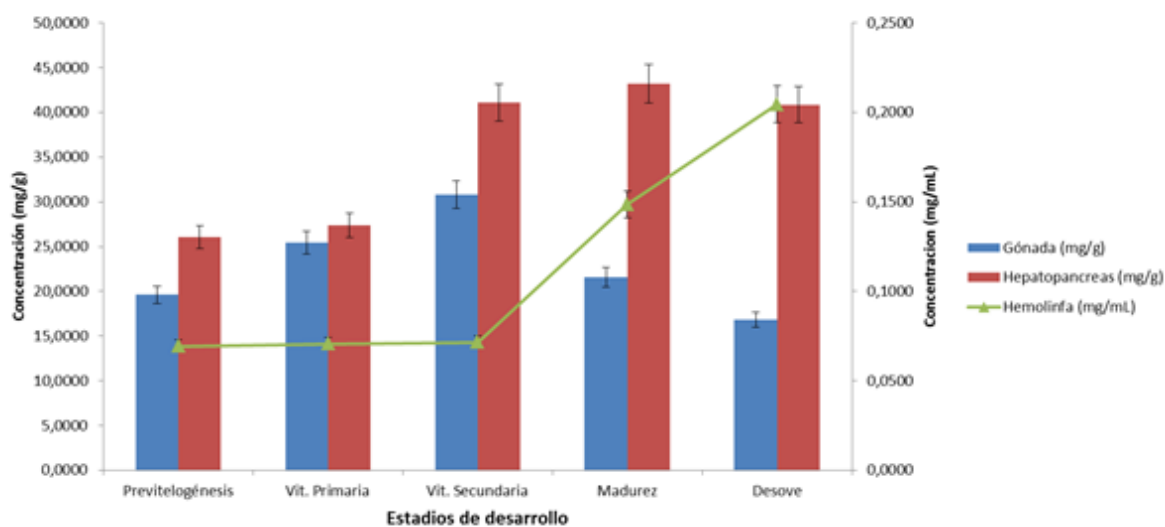


Figura 180. Concentración de carbohidratos totales (tejidos) y glucosa (hemolinfa) durante los diferentes estadios de la ovogénesis de *L. santolla*.

Las correlaciones de Pearson realizadas entre las variables morfológicas (peso total, ancho y largo del caparazón) y las variables bioquímicas (proteínas totales, lípidos totales, carbohidratos totales, triglicéridos y glucosa) en los tres tejidos analizados fueron bajas, no significativas e incluso algunas negativas (Tabla XII).

Tabla XII. Coeficientes de correlaciones de Pearson's (r) entre las variables morfológicas de hembras de centolla (*L. santolla*) y las variables bioquímicas de los tres tejidos analizados.

Componentes bioquímicos	Variables morfológicas		
	Peso total (Kg)	Ancho caparazón (cm)	Largo caparazón (cm)
Hemolinfa			
PT (mg mL ⁻¹)	0.020	-0.018	-0.044
Tg (mg mL ⁻¹)	0.156	0.170	0.069
Gl (mg mL ⁻¹)	0.307	0.357	0.210
Hepatopáncreas			
PT (mg g ⁻¹)	-0.201	-0.222	-0.158
LT (mg g ⁻¹)	0.279	0.287	0.171
Tg (mg g ⁻¹)	0.011	0.018	-0.040
CT (mg g ⁻¹)	0.059	0.066	0.001
Ovario			
PT (mg g ⁻¹)	0.153	0.120	0.072
LT (mg g ⁻¹)	0.212	0.213	0.095
Tg (mg g ⁻¹)	0.133	0.147	0.055
CT (mg g ⁻¹)	-0.231	-0.253	-0.178

PT: Proteínas totales; LT: Lípidos totales; Tg: Triglicéridos; CT: Carbohidratos totales; Gl: Glucosa.

Los análisis de correlación de Pearson realizados entre los componentes bioquímicos determinados en cada uno de los tejidos y el diámetro teórico de los ovocitos mostraron resultados interesantes (Tabla XIII). Se encontró una correlación positiva y estadísticamente significativa ($P < 0.05$) en los componentes de proteínas totales (0.72), lípidos totales (0.89) y triglicéridos (0.88) en el ovario. En el hepatopáncreas se observaron correlaciones altas, positivas y significativas en los lípidos totales (0.89), triglicéridos (0.71) y carbohidratos totales (0.77), en cuanto a la hemolinfa, se encontró una correlación positiva y significativa en triglicéridos (0.85) y glucosa (0.76).

Tabla XIII. Coeficientes de correlación de Pearson's (r) entre el diámetro de los ovocitos y las variables bioquímicas analizadas en ovario, hepatopáncreas y hemolinfa de las hembras de centolla (*L. santolla*).

Variables	Ovario				Hepatopáncreas				Hemolinfa		
	PT	LT	Tg	CT	PT	LT	Tg	CT	PT	Tg	Gl
Diámetro de ovocitos	0.73*	0.89*	0.88*	-0.26	-0.10	0.89*	0.71*	0.77*	0.46	0.85*	0.76*

*Correlación estadísticamente significativa ($P < 0.05$). PT: Proteínas totales; LT: Lípidos totales; Tg: Triglicéridos; CT: Carbohidratos totales; Gl: Glucosa.

Los triglicéridos, fueron el único componente que mostró una alta y positiva correlación entre el diámetro de los ovocitos y su concentración en los tres tejidos analizados (fig. 21)

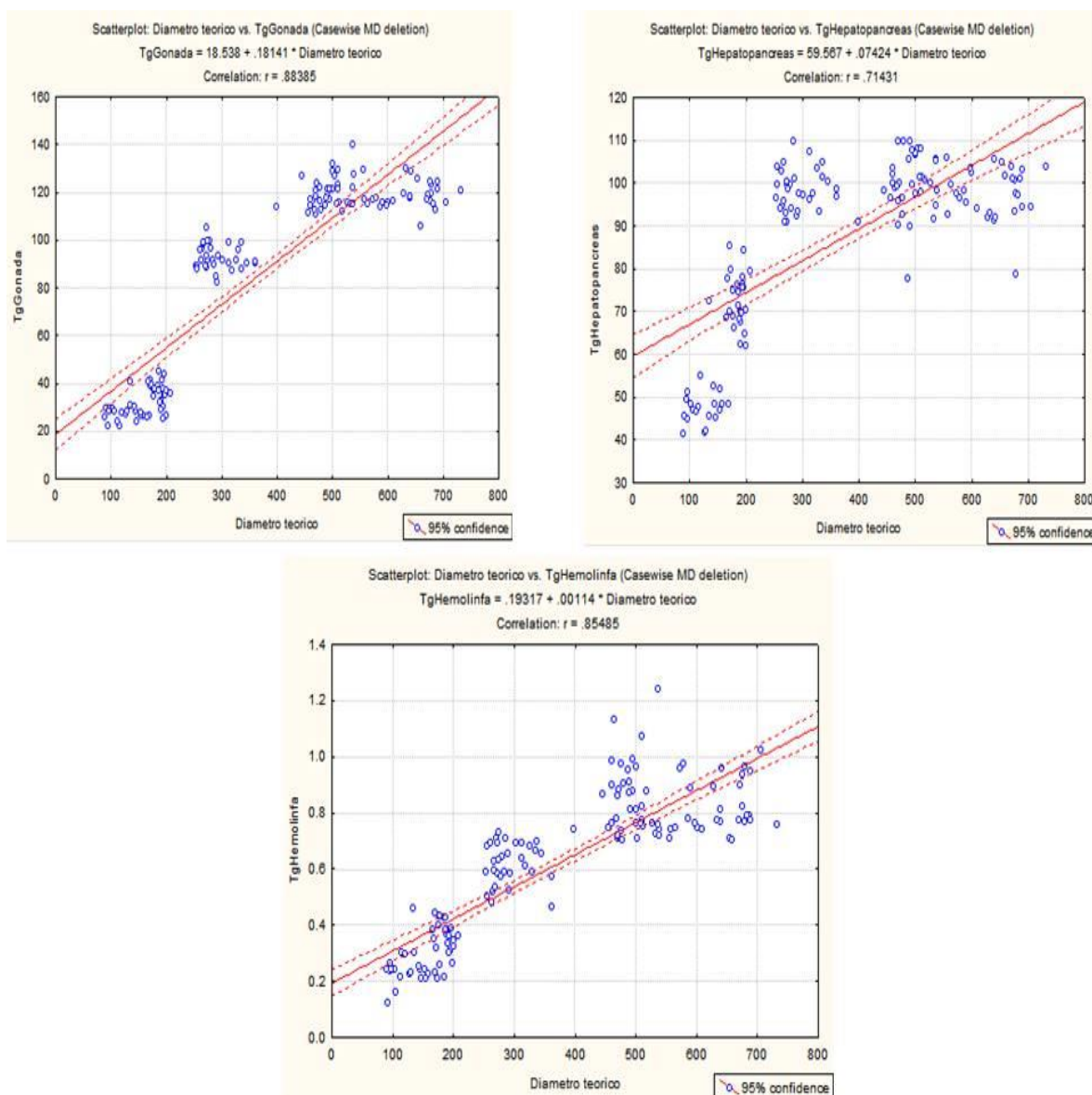


Figura 21. Correlaciones entre la concentración de triglicéridos y el diámetro teórico de los ovocitos de *L. santolla* en cada uno de los tejidos analizados (Gónada, hepatopáncreas y hemolinfa respectivamente).

7.3. Caracterización molecular de la vitelogénesis de hembras del crustáceo subantártico centolla (*L. santolla*).

7.3.1. Aislamiento del transcrito de vitelina de gónada y hepatopáncreas.

La amplificación de los pares de primers diseñados para el fragmento de vitelina (Anexo 1) se realizó como se mencionó en la sección 6.5.1. En la figura 22 se muestra un gel de agarosa con los diferentes fragmentos amplificados por algunos de los primers diseñados, el resto de pares de primers no generaron amplificación. Adicionalmente se realizó la combinación de algunos pares de primers para tratar de obtener otras secuencias del transcrito (Fig. 23). Debido a que los primers que se diseñaron fueron degenerados amplificaron inespecíficamente y se obtuvieron un total de 50 amplicones los cuales fueron enviados a secuenciar para su posterior análisis bioinformático.

El análisis *in silico* de similitud por BLAST, permitió identificar que las secuencias obtenidas de la amplificación de Vtgd6-F y Vtgd6-R (Fig. 22, Carril 8) tienen similitud con otras secuencias de invertebrados contenidas en GenBank: sickie-like de *Orussus abietinus*, con un 88% de similitud con un E-value = $6e-06$; importin subunidad beta-1-like del crustáceo *Limulus polyphemus* con un 77% de similitud y un E-value = $1e-34$; hemocytin-like gene del crustáceo *Limulus polyphemus* con una similitud del 33% con un E-value = $3e-31$; ferritin mRNA del crustáceo *Scylla paramamosain* con una similitud del 81% con un E-value = $9e-66$; dipeptidase 1-like de *Fopius arisanus* con un 72% de similitud con un E-value = $9e-09$; proliferation-associated protein 2GA (PA2G4) de *Limulus polyphemus* con una similitud del 65% con un E-value = $2e-20$.

Los fragmentos obtenidos con el par de cebadores Vtg5-F y Vtg5-R (Fig. 22, carril 7) tienen similitud con otras secuencias de invertebrados contenidas en GenBank como EF-Tu d2 protein de *Cherax quadricarinatus* con una similitud de 33% con un E-value = 2.1. Los fragmentos obtenidos con el par de cebadores Vtg8-F/Vtg8-R y Vtg9-F/Vtg9-R no presentaron similitud con otras secuencias de invertebrados contenidas en GenBank (Fig. 22, carril 2 a 6).

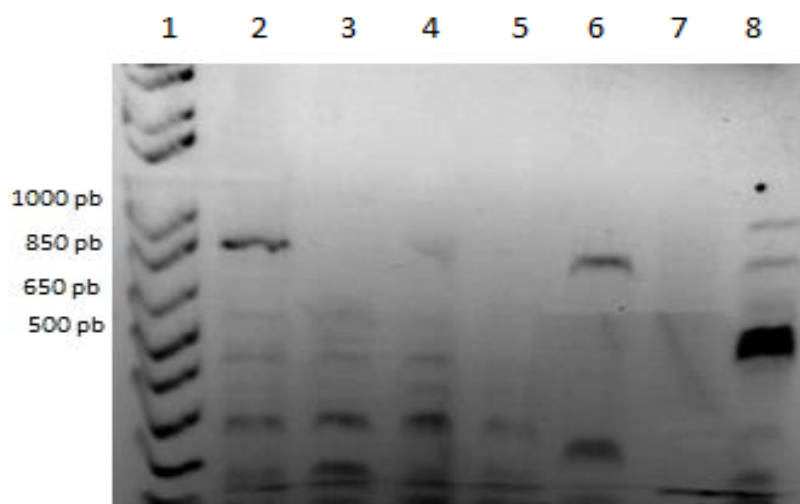


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de fragmentos amplificados. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen), del 2 al 5 amplificaciones con los primers Vtg9, el 6 la amplificación de primers Vtg8, el 7 la amplificación de primers Vtg5 y el 8 la amplificación de primers Vtg6 (anexo 1).

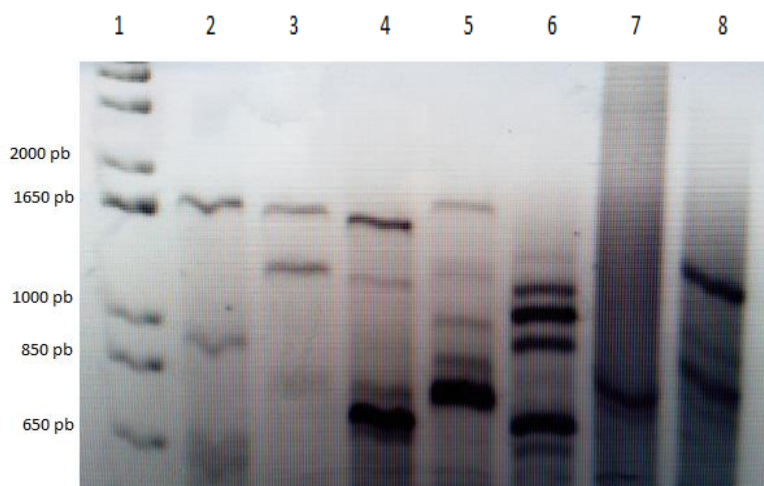


Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de fragmentos amplificados con pares de primers combinados. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen), el 2 amplificaciones con Vtg6-F y Vtg4-R, el 3 y 4 la amplificación de Vtg4-F y Vtg4-R, el 5 la amplificación de Vtg4-F y Vtg5-R, el 6 la amplificación de Vtg5-F y Vtg4-R, el 7 y 8 la amplificación de Vtg5-F y Vtg6-R.

Los fragmentos obtenidos de Vtg6-F y Vtg4- R (Fig. 23, carril 2) tienen similitud con otras secuencias contenidas en Gen Bank: hemoglobina (HBB) de *Homo sapiens* con una similitud de 87% y un E-value = $3e-141$. Los fragmentos obtenidos de Vtg4-F y Vtg4-R (Fig. 23, carril 3 y 4) presentan similitud con: proteína carotenoide isómero oxigenasa de *Harpegnathos saltator* con una similitud del 67% con un E-value = $2e-09$. Los fragmentos obtenidos de Vtg5-F y Vtg4-R (Fig. 23, carril 6) tienen similitud con: proteína CDP-diacilglicerol pirofosfatasa de *Pragia fontium* con una similitud de 33% con un E-value = 8.3. Del resto de los fragmentos secuenciados no fue posible obtener secuencias que pudieran ser identificadas por similitud con otras contenidas en Gen Bank.

8. DISCUSIÓN

8.1. Caracterización morfohistológica e histoquímica de la ovogénesis y vitelogénesis de hembras del crustáceo subantártico centolla (*L. santolla*).

La ovogénesis y el desarrollo ovárico son procesos ampliamente estudiados en los crustáceos decápodos, principalmente en las especies con interés comercial como algunos peneidos, langostas y cangrejos, debido a que su explotación como recursos pesqueros o la elaboración de biotecnologías para su cultivo en granjas, exigen un amplio estudio y un preciso conocimiento de su biología reproductiva, para poder inferir, por ejemplo, los periodos de desove. Los estudios sobre el proceso reproductivo en crustáceos en general son diversos y variados debido a la gran diversidad del grupo, por ejemplo estudios realizados en decápodos con respecto a la estructura interna del ovario y a su desarrollo durante el ciclo de madurez gonadal (ovogénesis), han revelado un alto grado de diferenciación, en cuanto a formas, procesos y estructuras.

La descripción del desarrollo de la ovogénesis en decápodos mediante técnicas histológicas generalmente involucra la división del proceso en cinco estadios o fases de desarrollo distintos (proliferación, previtelogénesis, vitelogénesis primaria, vitelogénesis secundaria y madurez), sin embargo, existen estudios en los que el proceso de ovogénesis es dividido en más de cinco estadios, por ejemplo Abdu *et al.* (2000) sugirieron ocho estadios de desarrollo gonadal para la langosta *Cherax quadricarinatus*, mientras que Meeratana y Sobhon (2007) para *Macrobrachium rosenbergii* sugirieron ovogonias y seis estadios de desarrollo como parte del proceso de maduración de los ovocitos.

Para el crustáceo decápodo subantártico centolla (*L. santolla*), este es el primer estudio realizado sobre la caracterización del desarrollo de los procesos de ovogénesis y vitelogénesis de forma completa, utilizando herramientas histológicas e histoquímicas cuantitativas. En este estudio el proceso de

ovogénesis se dividió en cinco estadios o fases de desarrollo, considerando para la clasificación la frecuencia de cada tipo de ovocitos, es decir, el estadio quedo determinado por el tipo o tipos de ovocitos más frecuentes en la muestra (Fig. 15). Adicionalmente, se lograron identificar ovogonias y 9 tipos diferentes de ovocitos basados en la forma, estructura, características y tamaño (diámetro) de los mismos. Los estadios asignados y los diferentes tipos de ovocitos descritos en este trabajo coinciden con lo reportado para otros decápodos (Tabla V).

En *L. santolla* el estadio de multiplicación (proliferación) está caracterizado por la presencia de ovogonias en constante división localizadas hacia la periferia del ovario (zona germinal) formando una especie de nido o clusters, donde las células germinales están en constante división produciendo ovocitos primarios los cuales conforme migran alejándose de la zona germinal hacia las periferias se diferencian en ovocitos previtelogénicos. Este tipo de estructuras en forma de nidos o clusters y la evolución de los ovocitos primarios a ovocitos previtelogénicos a medida que se alejan de la zona germinal ha sido observada y reportada para otras especies de decápodos, como por ejemplo el cangrejo araña *Libinia emarginata* (Hinsch y Cone, 1969) el cangrejo marino *Portonius pelagicus* (Ravi *et al.*, 2013) y el cangrejo de agua dulce *Travancoriana schirnerae* (Smija y Sudha Devi, 2015).

En la fase previtelogénica del desarrollo ovocitario se lleva a cabo una alta tasa de síntesis, se desarrollan diversos orgánulos en los ovocitos y se acumula una gran cantidad de ARNm en el citoplasma (Adiyodi, 1969). Se ha sugerido que toda esta actividad en la que el núcleo está involucrado y es necesaria la transferencia de material desde el mismo hacia el citoplasma genera la aparición de uno o más nucléolos hacia la periferia del núcleo (Adiyodi, 1969). Este tipo de ovocitos, en los que aparecen uno o más nucléolos en la periferia son denominados como ovocitos perinucléolo y marcan el inicio de la fase previtelogénica de la ovogénesis.

Particularmente, el estadio previtelogénico de la centolla (*L. santolla*) está caracterizado por la presencia de, además de las ovogonias en división, ovocitos

en nucléolo cromatina, perinucléolo temprano y perinucléolo tardío. En los ovocitos en estadio perinucléolo de la centolla se observa un solo y gran nucléolo de carácter fuertemente basófilo ubicado excéntricamente en la periferia del nucleoplasma, lo cual concuerda con otras especies de cangrejos decápodos como el cangrejo azul nadador *Portunus pelagicus* (Ravi *et al.*, 2013). Sin embargo, se han reportado otros decápodos con un mayor número de nucléolos, como en el cangrejo de agua dulce *Travancoriana schirnerae* con tres o cuatro nucléolos (Smija y Sudha-Devi, 2015) o el camarón *Penaeus japonicus* donde se observan de 5 a 6 nucléolos en la periferia del núcleo (Yano, 1988).

La presencia de vitelo proteínico y gotas de lípidos en los ovocitos, marca el final del estadio de previtelogénesis y el inicio de la fase vitelogénica. Este estadio está caracterizado principalmente por la acumulación de nutrientes (principalmente lipoproteínas) y esta acumulación provoca el incremento del diámetro de los ovocitos aproximadamente al doble con respecto a su tamaño al inicio de la vitelogénesis (En *L. santolla* de 210.44 μm en vitelogénesis primaria a 507.98 μm en la etapa de madurez, tabla VII).

En la centolla (*L. santolla*) los ovocitos en una etapa temprana del proceso de vitelogénesis comienzan a mostrar pequeñas gotas lipídicas y conforme el proceso de vitelogénesis avanza se acumulan pequeños gránulos de vitelo ligeramente acidófilos y de tamaño relativamente uniformes en la periferia del ovoplasma. Posteriormente, hacia la parte final de la vitelogénesis los ovocitos se vuelven más grandes y con una mayor cantidad de glóbulos de vitelo (Fig. 15). En este estadio se observan las células foliculares rodeando completamente al ovocito y conforme el proceso de vitelogénesis avanza hacia una etapa más tardía estas se vuelven más planas y alargadas, sin embargo, aparentemente no presentan cambios en su composición interna ya que su carácter continuó siendo altamente basófilo (Fig. 15). Estas características de las células foliculares en la etapa vitelogénica de la ovogénesis han sido reportadas anteriormente para el cangrejo ermitaño

Clibanarius clibanarius (Varadarajan y Subramoniam, 1980) y el cangrejo de agua dulce *Travancoriana schirnerae* (Smija y Sudha-Devi, 2015).

La forma en como aparecen y se acumulan las gotas lipídicas y gránulos de vitelo y las características morfológicas de los diferentes tipos de ovocitos que se presentan en el estadio vitelogénico generan la diferenciación de dos sub-estadios: vitelogénesis primaria y vitelogénesis secundaria, claramente diferenciados en su estructura, morfología y tamaño de los ovocitos (210.44 μm en el sub-estadio vitelogénesis primaria y 318.22 μm en el sub-estadio de vitelogénesis secundaria en *L. santolla*, tabla IX). En algunas especies de crustáceos como la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*, donde el ciclo de madurez fue dividido en dos grandes etapas (Vitelogénesis primaria y Vitelogénesis secundaria), la aparición de las gotas de lípidos señala el final de la vitelogénesis primaria (Abdu *et al.*, 2000).

Al igual que en otros grupos de crustáceos, el proceso de ovogénesis de *L. santolla* mostró un traslape entre las fases de previtelogénesis y vitelogénesis, encontrándose ovocitos en estadio previtelogénico e incluso ovogonias en la cercanías a la zona germinal durante la fase vitelogénica, así mismo, se observó un desarrollo sincrónico en los subestadios ováricos desarrollando cohortes de ovocitos (Fig. 15).

La etapa de madurez de *L. santolla* presenta una gran cantidad de ovocitos postvitelogénicos los cuales alcanzaron su máximo tamaño debido a una alta acumulación de gránulos de vitelo generando que el ovoplasma se vuelva de un carácter altamente basófilo (Fig. 15), además se observa la presencia de ovocitos con migración de la vesícula germinal hacia uno de sus extremos cuyo proceso ocurre en ovocitos completamente maduros y que a su vez son los ovocitos de mayor tamaño caracterizados para esta especie (Tabla VIII). Sin embargo aun cuando se considera un ovario maduro debido a la gran cantidad de ovocitos presentes en este estadio, se continúan apreciando algunos ovocitos en fases de

desarrollo más tempranas lo que respalda la teoría del desarrollo sincrónico del ovario por cohortes.

La última etapa caracterizada para la centolla (*L. santolla*) en este trabajo fue la etapa de desove en la que se incluyeron los ovocitos con rompimiento de la vesícula germinal (RGV) y los ovocitos atrésicos. Aunque los ovocitos RVG no mostraron una diferencia significativa en su tamaño con respecto a los ovocitos maduros, es importante considerar que entre un tipo de ovocito y otro ya no ocurre la acumulación de reservas dentro del mismo si no que únicamente se presentan cambios estructurales en la vesícula germinal a fin de continuar con el proceso de ovulación (desove).

Uno de los cambios estructurales en los ovocitos que preceden a la ovulación es el rompimiento de la vesícula germinal. Los ovocitos durante su maduración se encuentran arrestados en la segunda profase meiótica formando lo que se denomina vesícula germinal y una vez que alcanzan completamente su madurez se reinicia el proceso de meiosis, para lo cual la vesícula germinal se rompe y se presentan los pasos siguientes en el proceso de meiosis hasta detenerse nuevamente en la etapa de metafase de la segunda división meiótica y permanecer así hasta su fecundación (Yano, 1988). En *L. santolla* se encontraron ovocitos que presentaron el rompimiento de la vesícula germinal lo cual indica que el ovario se encuentra en la etapa de ovulación o desove, a su vez, también se identificaron ovocitos atresicos en algunas muestras lo que indicaba que se había realizado un proceso de desove. La presencia de ovocitos atresicos en ovarios con ovocitos maduros, reafirman la teoría de que *L. santolla* podría realizar eventos consecutivos de desove durante una misma temporada reproductiva.

La maduración sincrónica de los ovocitos ocurre de igual manera en otros crustáceos (Bell y Lighthner, 1988; Abdu *et al.*, 2000; Elorza y Dupré, 2000; Vázquez *et al.*, 2008), encontrándose dominancia de los ovocitos previtelogénicos o vitelogénicos de acuerdo al estadio de desarrollo de la gónada, esta característica que presentan las hembras de centolla es muy importante para este

estudio de investigación, ya que más allá de las comparaciones morfométricas y morfológicas de los ovocitos que se puedan obtener del resultado de este trabajo con las de otros crustáceos decápodos, el propósito de este estudio fue caracterizar de una manera profunda y cuantitativa el proceso de ovogénesis y vitelogénesis y además identificar características o indicadores cuantitativos del nivel de desarrollo de los diferentes tipos de ovocitos que sustenten la estrategia reproductiva de las hembras de *L. santolla*.

La presencia de ovogonias, ovocitos previtelogénicos y vitelogénicos junto con estadios maduros en el estadio III del desarrollo gonadal de *L. santolla* sugiere que a medida que avanza el proceso de maduración (ovogénesis) algunos ovocitos crecen rápidamente mientras que otros permanecen inactivos, por lo que diferentes tipos de ovocitos dentro de cada estadio ovárico se pueden desarrollar de manera independiente dentro del ovario de *L. santolla*, preparándolo para posibles desoves parciales o consecutivos en una temporada reproductiva. Esta condición que refleja la capacidad para realizar rápidamente eventos sucesivos de maduración y desove durante su periodo reproductivo natural, es una característica de especie desovadoras múltiples, la cual se ha observado en otras especies de crustáceos como *Macrobrachium olfersi* (Mossolin y Bueno, 2002) y *Macrobrachium rosenbergii* (Meeratana y Sobhon, 2007), en las que se ha observado que hembras portadoras de embriones próximos a eclosionar, presentan ovarios en estado de madurez avanzada lo que indica que el desarrollo gonadal en estas especies es usualmente concomitante con el desarrollo de los embriones, indicando desoves consecutivos durante sus respectivas épocas reproductivas, procesos que requieren de mucha energía, lo cual explica la gran cantidad de lípidos identificados histoquímicamente (Fig. 16; Tablas IX y X) en los ovarios de las hembras de *L. santolla*.

Al respecto se caracterizó mediante histoquímica la concentración de dos tipos de lípidos durante las diferentes etapas del desarrollo de la ovogénesis: triglicéridos y fosfolípidos. Los triglicéridos mostraron una mayor acumulación conforme

avanzaba el proceso de ovogénesis, encontrándose la máxima concentración de estos durante la etapa de vitelogénesis secundaria la cual se mantuvo durante el resto de la madurez. Estos resultados son esperados debido a que los triglicéridos son utilizados como fuente de energía y son también almacenados como reservas energéticas (Harrison, 1990). Por su parte los fosfolípidos mostraron un comportamiento diferente, encontrándose concentraciones más altas en la fase previtelogénica y disminuyendo conforme avanzaba la maduración gonadal, lo cual es un reflejo de su importante función como constituyente del citoplasma y las diversas membranas celulares (Harrison, 1990) ya que durante la etapa previtelogénica se genera una alta tasa de síntesis de orgánulos, particularmente la mayor concentración la presenta el ovocito perinucleolo temprano que como se discutió anteriormente es el tipo de ovocito con mayor actividad sintética durante el proceso de maduración.

La gran acumulación de reservas nutritivas en los ovocitos de *L. santolla*, genera ovocitos maduros con un incremento en su tamaño de aproximadamente el 333% con respecto al inicio de la vitelogénesis. Esta gran acumulación de reservas nutritivas puede deberse a que esta especie presenta un desarrollo indirecto (presenta una fase larvaria en lugar de emerger un juvenil directamente del huevo) y sus larvas son de carácter lecitotrófico, es decir, dependen completamente de las reservas del vitelo para su desarrollo durante su desarrollo al estadio de primer juvenil. Este porcentaje contrasta el camarón *Penaeus japonicus* cuyas larvas se alimentan principalmente de algunas diatomeas y *Artemia salina*, es decir, es una especie planctotrófica (Villegas y Kanasawa, 1980), que presenta un menor aumento en el tamaño de sus ovocitos, generando ovocitos maduros tan solo 180% más grandes que en la fase inicial de la vitelogénesis.

La cantidad y calidad del vitelo acumulado durante el desarrollo ovocitario son de vital importancia para el éxito reproductivo de especies con desarrollo larvario lecitotrófico debido a que una acumulación pobre puede ocasionar la generación de larvas de baja calidad y una eventual mortalidad de las mismas antes de su

etapa juvenil lo que desembocaría en una disminución de los individuos disponibles para sustentar la explotación comercial de la especie.

En la Tabla XIV se puede observar el tamaño de los diferentes ovocitos de *L. santolla* en comparación con tres especies tropicales y subtropicales de decápodos, además se puede observar las diferencias en los tipos de ovocitos caracterizados para cada especie. En este estudio se caracterizaron ovogonias y un total de 9 tipos de ovocitos para *L. santolla*, esto coincide con la caracterización de los ovocitos del cangrejo *R. ranina* y el camarón *P. japonicus* con excepción del ovocito con migración de vesícula germinal cuyas características y tamaño si fue determinados para *L. santolla* en este estudio, pero para las otras dos especies no se realizó su caracterización.

La importancia cuantitativa de la descripción de los tamaños promedios de los ovocitos durante el proceso de madurez gonadal en crustáceos, radica en la posibilidad que tienen hembras de ciertas especies producidas en cautiverio, de manifestar el mismo patrón de maduración gonadal en cuanto a coloración, distribución de las células al interior del ovario y sincronía de ovocitos previtelogénicos, vitelogénico y maduros, que el encontrado en organismos normales o en terreno, pero no el mismo tamaño de las células reproductivas presentando ovocitos más pequeños para todos los estadios del desarrollo y en consecuencia larvas más pequeñas y de menor calidad, por lo cual, es importante determinar indicadores cuantitativos de la calidad gonádica, como los desarrollados en este estudio (Tablas IX y X).

La identificación de estados de desarrollo de los ovocitos mediante características histológicas, histoquímicas y patrones de acumulación de vitelo ha sido utilizada por otros autores para determinar indicadores del grado de madurez de las hembras de crustáceos decápodos (Arcos *et al.*, 2011) y de moluscos bivalvos (Arcos *et al.*, 2009; Arcos *et al.*, 2015). Lo que facilita el manejo de reproductores en terreno y principalmente para experiencias de manejo y apareamientos controlados mediante la acuicultura donde la unión de hembras maduras próximas

a desovar, junto con machos reproductores activos, es la clave en el éxito de esta actividad acuícola.

Tabla XIV. Comparación del diámetro de los diferentes tipos de ovocitos descritos del crustáceo subantártico *L. santolla* con el cangrejo *Ranina ranina* (Minagua *et al.*, 1993) el camarón *Penaeus japonicus* (Yano, 1988) y el cangrejo araña *Maiopsis panamensis* (López-Martínez, Sometido).

Tipo de ovocito	Diámetro (µm)			
	<i>Lithodes santolla</i>	<i>Ranina ranina</i>	<i>Penaeus japonicus</i>	<i>Maiopsis panamensis</i>
Ovogonia en multiplicación	23.45	10-13	10	18.38
Ovocito nucléolo cromatina	51.56	14-19	16- 34	55.23
Ovocito perinucleolo temprano	79.25	17-26	30- 80	ND
Ovocito perinucleolo tardío	126.34	22-64	68- 88	ND
Ovocito glóbulo de aceite	183.32	37-120	80-160	136.9
Ovocito glóbulo de vitelo temprano	229.74	144-266	110-146	210.74
Ovocito glóbulo de vitelo tardío	318.22	237-338	128-237	349.13
Ovocito post-vitelogénico	462.83	323-471	200-264	ND
Ovocito con migración de vesícula germinal	569.17	ND	ND	ND
Ovocito con rompimiento de vesícula germinal	610.32	450-507	224-288	417.77

ND.- Estadio no descrito

8.2. Movilización de las reservas energéticas durante la vitelogénesis de hembras del crustáceo subantártico centolla (*L. santolla*).

8.2.1. Proteínas totales.

Un proceso importante en el desarrollo gonadal es la vitelogénesis donde se producen, transportan y almacenan proteínas de vitelo (Quackenbush, 1989; Tsukimura, 2001). En decápodos está documentado que durante la fase tardía de la vitelogénesis se produce la acumulación de proteínas tipo vitelinas producidas en algún tejido extra-ovárico, estas vitelinas son transportadas vía hemolinfa hacia el ovario para su posterior incorporación en los ovocitos (Fig. 3). También se ha comprobado que uno de los tejidos sintetizadores de proteínas tipo vitelinas en los decápodos es el hepatopáncreas (Tsutsui *et al.*, 2000).

Un dato curioso obtenido en este estudio es que los tejidos de gónada y hepatopáncreas presentan prácticamente la misma concentración de proteínas en el estadio de previtelogénesis y para el estadio de vitelogénesis primaria aumentan prácticamente en la misma magnitud, sin embargo la concentración de proteínas en la hemolinfa durante esta fase no cambia y se mantiene similar a la de la etapa previtelogénica (Fig. 17), esto se puede interpretar como una ausencia de la movilización de proteínas durante las etapas tempranas de la ovogénesis. Esto concuerda con lo reportado en la literatura, donde se explica que en las etapas tempranas del desarrollo ovárico la síntesis de proteínas tipo vitelina se da por parte del ovario (vitelogénesis primaria) (Charniaux-Cotton, 1985).

Por otra parte en las etapas tardías (vitelogénesis secundaria y madurez) la concentración de proteínas en el ovario aumentó significativamente pero a diferencia de las etapas anteriores en el hepatopáncreas ya no se aprecia un aumento en la concentración de proteínas sino una disminución considerable en la concentración de este macronutriente, mientras que en hemolinfa la concentración de proteínas aumenta significativamente (Fig. 17).

Esta disminución de proteínas en el hepatopáncreas y el aumento significativo de las mismas en la hemolinfa y el ovario podrían sugerir que en *L. santolla* las proteínas se movilizan del hepatopáncreas al ovario en las fases tardías de la ovogénesis, posiblemente como proteínas tipo vitelinas indicando que para *L. santolla* el hepatopáncreas también funciona como tejido sintetizador de vitelinas. Esta afirmación podría comprobarse mediante técnicas inmunohistoquímicas, o mediante *hibridación in situ*, como las reportadas para otros decápodos donde se comprueba la síntesis de esta proteína en el hepatopáncreas (Tsutsui *et al.*, 2000).

Los resultados obtenidos para *L. santolla*, en los que la máxima concentración de proteínas se observó en los estadios con ovocitos próximos a madurar y maduros, coincide con lo reportado para otros crustáceos como *Parapenaeosis hardwickii* (Kulkarni y Nagabhushanam, 1979), *Crangon crangon* (Spaargaren y Haefner, 1994), *Penaeus indicus* (Quinitio y Millamena, 1992) y *Cherax quadricarinatus* (Rodríguez-González *et al.*, 2006).

Por último en el estadio de desove se mostró una disminución significativa en la concentración de proteínas en los tres tejidos analizados, la disminución en la concentración de proteínas en el ovario puede estar relacionada con los eventos de desove, en donde una gran cantidad de ovocitos maduros con una alta concentración de proteínas tipo vitelina han sido desovados ocasionando esta disminución en la concentración proteínica. Por su parte como el proceso de vitelogénesis secundaria a concluido, se deja de sintetizar proteínas de vitelo en el hepatopáncreas y su concentración proteica disminuye, a su vez, la movilización de vitelinas desde el hepatopáncreas se detiene lo que explica que la concentración de proteínas en la hemolinfa baje considerablemente.

8.2.2. Lípidos totales y triglicéridos.

El incremento observado en las concentraciones de lípidos totales y principalmente de triglicéridos en el ovario de *L. santolla* (Figs. 18 y 19) ocurre como resultado del proceso de maduración de los ovocitos, este incremento

coincide con los resultados obtenidos en la histoquímica de lípidos (Fig. 16, Tablas IX y X). Una gran acumulación de lípidos en el ovario a medida que avanza la maduración gonadal ha sido reportada para otros decápodos en diversos estudios (Galois, 1984; Palacios *et al.*, 2000; Rodríguez-González *et al.*, 2006). Dentro de los lípidos, los triglicéridos acumulados en el ovario proveen el combustible necesario para los procesos biosintéticos de la ovogénesis y la vitelogénesis, y son acumulados por los ovocitos en desarrollo (Harrison, 1990).

La movilización y acumulación de reservas lipídicas en algunos tejidos ha sido anteriormente documentada para algunos crustáceos (Millamena y Pascual, 1990; Mourente y Rodríguez, 1991; Palacios *et al.*, 2000) y algunos de estos autores describen que el aumento de los lípidos en el ovario va acompañado de una disminución de lípidos en el hepatopáncreas sugiriendo una posible movilización desde este tejido hacia el ovario. Sin embargo, en este estudio no se observó una disminución en la concentración de lípidos totales ni triglicéridos en el hepatopáncreas conforme aumentaba la concentración de los mismos en el ovario, pero por otra parte hubo un aumento significativo en la concentración de triglicéridos en hemolinfa conforme avanzaba el desarrollo gonadal (Fig. 19), lo cual sugiere que para *L. santolla* la movilización de lípidos podría darse a partir de otro tejido de reserva o provenir directamente de la dieta.

Este comportamiento en el que no se observa una disminución de los lípidos en el hepatopáncreas durante el desarrollo ovárico ha sido reportado también para otros crustáceos (Castille y Lawrence, 1989; Cavalli *et al.*, 2001; Rosa y Nunes, 2002) sugiriendo de igual forma que los requerimientos lipídicos en el desarrollo del ovario podrían ser más dependientes de la ingesta dietaria que de las reservas lipídicas en el hepatopáncreas. Se ha sugerido que *L. santolla* es una especie que presenta estrategias para el ahorro de reservas energéticas principalmente lípidos y que presenta una utilización más económica de la energía disponible (Kattner, *et al.*, 2003; Surot-Navarro, 2006) estas estrategias podrían estar involucradas en el

hecho de que no se observe un decremento en la cantidad de lípidos almacenados en el hepatopáncreas.

8.2.3. Carbohidratos totales y glucosa.

En este estudio se observó que la concentración de carbohidratos totales en el hepatopáncreas de *L. santolla* se mostró constante en los estadios tempranos del desarrollo gonadal y tuvo un aumento significativo en su concentración hacia la fase de vitelogénesis secundaria misma que se mantuvo similar el resto del desarrollo gonadal (Fig. 20), esto podría sugerir la utilización de carbohidratos durante los primeros estadios de desarrollo, sin embargo la concentración de glucosa evaluada en hemolinfa indica una mayor movilización de los carbohidratos hacia el final del desarrollo gonadal ya que durante las primeras etapas la concentración de glucosa en hemolinfa se mantiene constante y técnicamente baja con respecto al aumento significativo que se observa en las etapas tardías.

De forma similar al hepatopáncreas el ovario presenta un aumento en la concentración de carbohidratos durante las etapas iniciales pero durante las etapas de madurez y desove la concentración de carbohidratos disminuye significativamente, este comportamiento coincide con el aumento de glucosa en la hemolinfa. Aunque se ha documentado que los carbohidratos no son una fuente esencial de energía para los crustáceos (Anger, 2001; Harrison, 1990) estos son almacenados y movilizados para servir como precursores de metabolitos intermediarios en la producción de energía (Harrison, 1990). El proceso de desove o desoves parciales que podría presentar esta especie, generan un estrés debido a la enorme demanda de energía en la cual posiblemente se utilizan carbohidratos como fuente secundaria para suplir esta demanda energética. Este patrón ha sido observado en la langosta *C. quadricarinatus* (Rodríguez-González *et al.*, 2006) donde reportan una disminución de carbohidratos en el ovario en las etapas tardías del desarrollo gonadal.

Se ha reportado una baja concentración de carbohidratos en huevos y embriones de algunos crustáceos decápodos (Clarke, 1982; Roustaian y Kamarudin, 2001; García-Guerrero *et al.*, 2003), lo que sugiere que este componente no es usado como una fuente importante de energía durante el desarrollo embrionario para los decápodos. Al respecto *L. santolla* presenta un desarrollo larvario lecitotrófico y los requerimientos energéticos tanto del embrión como de las larvas son suplidos predominantemente por las reservas lipídicas contenidas en los huevos (Lovrich *et al.*, 2003).

8.2.4. Correlaciones entre variables morfológicas y bioquímicas como indicadores de madurez gonadal.

En algunos estudios se ha propuesto la utilización de componentes bioquímicos como indicadores cuantitativos indirectos de la calidad de huevos o el grado de desarrollo gonadal de crustáceos decápodos (Arcos, 2004; Arcos *et al.*, 2011). Al respecto para *L. santolla* no se ha realizado ningún estudio, donde se evalúen los diferentes componentes bioquímicos presentes en los distintos tejidos involucrados en la reserva y movilización de nutrientes durante el proceso reproductivo y tampoco se ha planteado la utilización de estos componentes como un indicador indirecto del grado de madurez de una hembra. En este estudio se estimó la correlación que existe entre la concentración de los diversos componentes bioquímicos y el diámetro de los ovocitos como variable de madurez gonadal.

Las proteínas mostraron una correlación positiva y significativa con el diámetro de los ovocitos en el ovario (0.73). La correlación encontrada entre la concentración de proteínas en el ovario y el desarrollo ovocitario, puede deberse a que durante el desarrollo de los ovocitos estos sintetizan y acumulan proteínas de tipo vitelina durante la vitelogénesis primaria y durante la vitelogénesis secundaria acumula vitelinas provenientes de tejidos exógenos como el hepatopáncreas que son transportadas vía hemolinfa (Charniaux-Cotton, 1985; Lee *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2006; Arcos *et al.*, 2011), sin embargo, en el hepatopáncreas no se observó

ninguna correlación significativa entre este componente y el diámetro de los ovocitos.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Rodríguez-González *et al.* (2006) para la langosta *C. quadricarinatus* (Fig. 24) donde no se observó correlación entre el grado de madurez (medido en este estudio como índice gonadosomático) y la concentración de proteínas en el hepatopáncreas. La ausencia de una correlación entre la concentración de proteínas en el hepatopáncreas y el desarrollo gonadal es consistente con las observaciones de Chang y O' Connor (1983) para crustáceos decápodos.

La concentración de proteínas totales en la hemolinfa no mostró una correlación significativa con respecto al grado de madurez de los ovocitos, sin embargo, en otros estudios se han utilizado herramientas más específicas como cuantificación de vitelinas por ELISA en hemolinfa encontrando una correlación entre la concentración de esta lipoproteína y el grado de madurez del ovario (Arcos, 2004; Arcos *et al.*, 2011).

Por su parte la concentración de triglicéridos resultó ser un buen indicador del grado de madurez de los ovocitos de *L. santolla*. La concentración de este componente en los ovocitos aumenta conforme avanza su maduración, como se aprecia en los resultados obtenidos tanto en la parte histoquímica (Fig. 17, Tablas IX y X) como en la parte bioquímica (Fig. 19). Lo cual fue sustentado por la correlación positiva y altamente significativa entre la concentración de triglicéridos y el tamaño de los ovocitos en los tres tejidos analizados (gónada, hepatopáncreas y hemolinfa) (Fig. 21), estos resultados sugieren que la concentración triglicéridos en la hemolinfa de *L. santolla* puede ser utilizada como un indicador del grado de madurez que presenta una hembra determinada.

La utilización de indicadores bioquímicos medidos en la hemolinfa puede constituir una forma fácil y rápida de determinar el grado de madurez presente en una hembra, pero sobre todo son métodos no invasivos que permiten la estimación del

parámetro sin la necesidad de sacrificar al organismo, lo cual remarca la importancia de su utilización en organismos protegidos o para seleccionar posibles organismos reproductores en cultivos (Arcos, 2004; Arcos *et al.*, 2011).

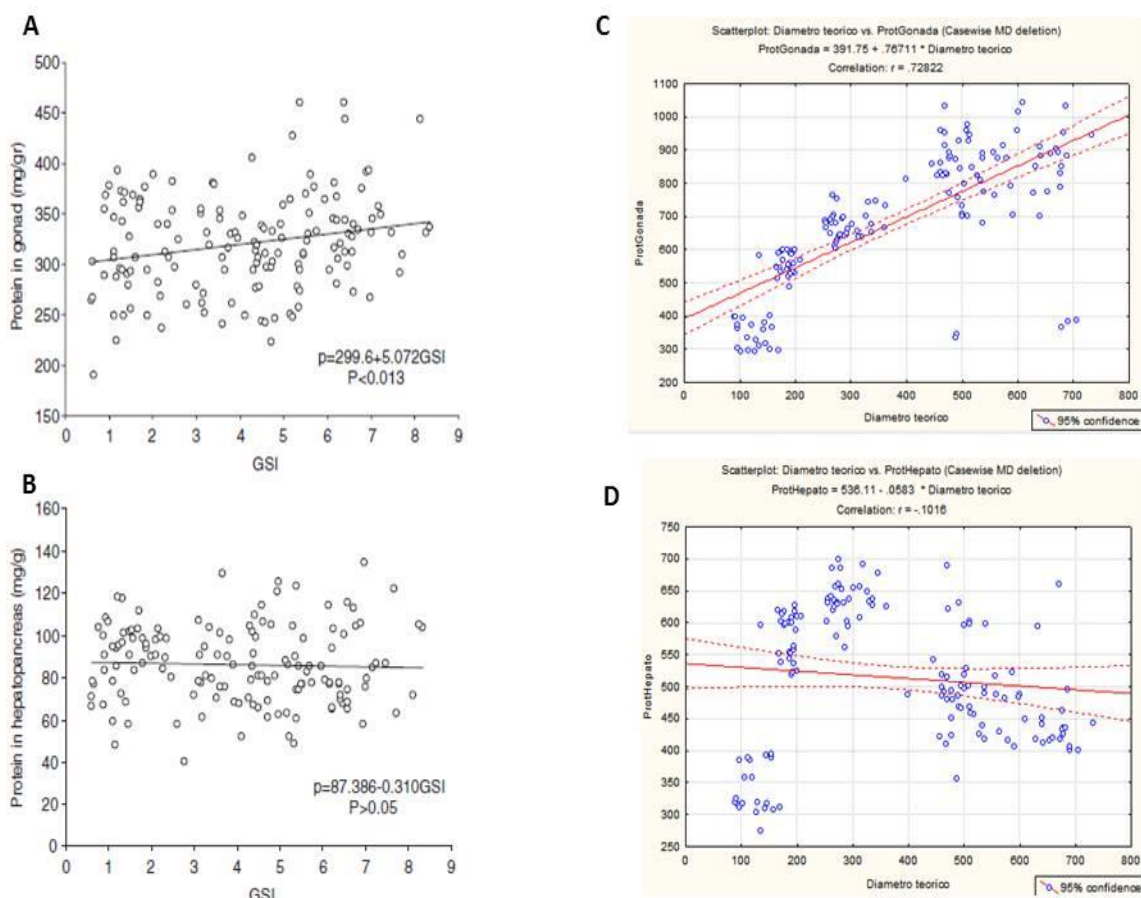


Figura 24. Comparación de las correlaciones entre el desarrollo gonadal y la concentración de proteínas en gónada y hepatopáncreas de *C. quadricarinatus* (A: gonada, B: hepatopáncreas) y *L. santolla* (C: gónada, D: hepatopáncreas).

8.3. Caracterización molecular de la vitelogénesis de hembras del crustáceo subantártico centolla (*L. santolla*).

Uno de los genes más importantes que intervienen en el proceso de desarrollo gonadal es el gen de la vitelina, esto debido a la importancia que presenta esta proteína en el desarrollo de la vitelogénesis. Numerosos estudios se han enfocado en la caracterización de este gen para diversos crustáceos decápodos, principalmente aquellos con un interés comercial, sin embargo, no existe ningún estudio que caracterice el gen de vitelina de *Lithodes santolla*, ni tampoco existen estudios moleculares que eluciden los diversos mecanismos de expresión génica con los que se desarrolla el proceso de vitelogénesis en esta especie.

A fin de aportar información sobre estos aspectos moleculares, en este estudio se buscó caracterizar el gen de vitelina mediante su amplificación y secuenciación. Un total de 50 amplicones fueron obtenidos mediante la utilización de primers degenerados diseñados a partir de secuencias de este gen previamente reportadas para otros crustáceos (anexo 2, Tabla III), sin embargo, al realizar el análisis de blast no se obtuvieron similitudes de las secuencias obtenidas con secuencias vitelínicas de crustáceos decápodos reportadas en las bases de datos mundiales (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (Ver sección 7.3.1).

La utilización de primers degenerados para la amplificación de *novó* de un gen, es una herramienta ampliamente utilizada en biología molecular, sin embargo, el hecho de que no sean primers específicos para la especie en cuestión y que a su vez cuenten con bases degeneradas, podría ocasionar que estos se unan a fragmentos no deseados de otros transcritos, tanto como el número de combinaciones posibles lo permitan.

Otra desventaja de diseñar primers degenerados es que es necesario alinear una cantidad considerable de secuencias del gen que se desea amplificar, estas secuencias deben de ser de especies lo más cercanas posibles a la especie en estudio. Utilizar especies ontológicamente lejanas a la especie en estudio podría significar que los primers diseñados no amplifiquen el gen esperado por

encontrase diferencias en algunas de las bases o en la secuencia del transcrito, sin embargo, no siempre existen secuencias reportadas para especies cercanas a la especie en estudio. Para este estudio las especies utilizadas se presentan en la tabla III, estas especies presentan la particularidad de ser especies tropicales y subtropicales, difiriendo en esta condición con la especie en estudio la cual es una especie sub-antártica, además de pertenecer a un infraorden distinto al de la especie en estudio debido a que actualmente no existen secuencias reportadas para el gen de vitelina de especies cercanas a *L. santolla* o especies pertenecientes al infraorden Anomura.

Se ha demostrado que el gen de vitelina en crustáceos decápodos es un gen grande de aproximadamente 7-8 mil pares de bases (Tablas II y III), la alineación de genes grandes generan una gran cantidad de gaps y hace más difícil la localización de regiones conservadas, además algunos estudios indican que el gen de vitelina en crustáceos solo presenta pequeñas regiones conservadas debido a que presentan una amplia variabilidad entre una especie y otra. Todos estos factores influyen en la eficacia de los primers diseñados aumentando las posibilidades de obtener transcritos no deseados.

Por otra parte, una de las secuencias obtenidas en este estudio de 320 pb tuvo homología con la proteína ferritina del crustáceo *Scylla paramamosain* con una similitud del 81% con un E-value = $9e-66$, al igual que con la de otros crustáceos como *Portunus trituberculatus* (similitud 80%, E-value= $1e-63$) y *Litopenaeus vannamei* (similitud 76%, E-value= $2e-55$). La ferritina es una proteína que desempeña la función de almacenamiento de hierro para su utilización de forma controlada en diversos procesos biológicos (Andrews, 2010). En crustáceos decápodos el gen completo de ferritina va desde los 767 pb para *Scylla paramamosain* (Zhang *et al.*, 2011) hasta los 1249 pb en *L. vannamei* (Hsieh *et al.*, 2006) por lo cual la secuencia de 320 pares de bases obtenida para *L. santolla* podría ser una fracción de la secuencia completa.

Es importante mencionar que la mayor parte de la información disponible sobre la función de este gen tanto en peces como algunos crustáceos se basa principalmente en procesos de respuesta inmune (Neves *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011), sin embargo, el transcrito de ferritina se aisló de una muestra de gónada en un estadio de madurez por lo cual surge la interrogante sobre el papel que desempeña esta proteína en el proceso de maduración gonadal de *L. santolla*, lo cual sería interesante abordar en estudios posteriores.

Otra de las secuencias de 268 pb tuvo similitud con una proteína PA2G4, esta proteína está asociada a la proliferación celular o a la regulación del ciclo celular, posiblemente mediante un efecto inhibitor de la replicación del ADN (Izuta *et al.*, 2004) y puede jugar un rol importante en el proceso reproductivo de *L. santolla*.

Por último, la proteína CDP-diacilglicerol pirofosfatasa de la cual se obtuvo una secuencia homóloga, es una enzima que interviene en el metabolismo de fosfolípidos (Oshiro *et al.*, 2003), mientras que la enzima carotenoide isómero oxigenasa participa en la transformación de diferentes tipos de carotenoides para producir diferentes tipos de pigmentos (Sui *et al.*, 2014), las vitelinas son proteínas que se encuentran asociadas a lípidos, glúcidos y carotenoides y esta asociaciones son modificaciones postraduccionales (Tsukimura, 2001) por lo que esta enzima podría participar de alguna forma en el proceso de unión de la proteína a los carotenoides.

9. CONCLUSIONES

- La vitelogénesis de *L. santolla* está caracterizada por cambios morfológicos, histoquímicos, bioquímicos y moleculares por lo cual la hipótesis es aceptada.
- La ovogénesis de *L. santolla* está caracterizada por 5 estadios de desarrollo gonadal, así como por ovogonias y 9 tipos distintos de ovocitos.
- Los resultados histológicos sugieren que *L. santolla* es una especie que presenta un desarrollo sincrónico por cohortes por lo que podría presentar múltiples desoves en un ciclo reproductivo.
- El comportamiento en la concentración de proteínas en los tejidos de gónada, hepatopáncreas y hemolinfa durante los diferentes estadios de desarrollo gonadal de *L. santolla*, sugieren una movilización de proteínas desde el hepatopáncreas hacia la gónada en las fases tardías de la ovogénesis.
- El comportamiento en la concentración de carbohidratos podría sugerir que *L. santolla* utiliza este componente como fuente de energía adicional en el proceso de desove.
- Se encontró una correlación positiva y significativa entre el diámetro teórico de los ovocitos y; la concentración de proteínas en gónada y hepatopáncreas; la concentración de lípidos en ovario y hepatopáncreas; la concentración de triglicéridos en los tres tejidos analizados; la concentración de carbohidratos en hepatopáncreas; la concentración de glucosa en hemolinfa.
- La concentración de triglicéridos en hemolinfa podría ser utilizada como un indicador bioquímico del grado de madurez de una hembra de *L. santolla*.

10. RECOMENDACIONES

Con la finalidad de coadyuvar al cuidado del recurso y si se piensa en un futuro incentivar un aprovechamiento de la especie mediante biotecnologías de acuicultura, se sugiere evaluar un ciclo anual utilizando las herramientas histológicas, histoquímicas y bioquímicas desarrolladas en esta investigación para ubicar los picos máximos de reproducción y determinar el uso de reservas energéticas en temporadas reproductivas y no reproductivas. Durante el desarrollo de esta investigación no fue posible obtener ejemplares todo el año, pero se sugiere en un futuro realizar muestreos espacio-temporales que puedan prospectar a mayor profundidad para tener una evaluación integral y completa.

Es importante analizar, mediante acuicultura controlada, la movilización de los triglicéridos en los tejidos reproductivos analizados durante la maduración gonádica de hembras, para comprobar la correcta viabilidad del uso de triglicéridos en hemolinfa como posibles indicadores bioquímicos del grado de madurez.

Por otra parte, sería interesante que se realizaran estudios posteriores con los resultados moleculares obtenidos para determinar las posibles implicaciones de los diferentes genes expresados durante el proceso reproductivo de *L. santolla*.

11. LITERATURA CITADA

- Abdu, U., G. Yehezkel, A. Sagi. 2000. Oocyte development and polypeptide dynamics during ovarian maturation in the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Invertebr. Repro. Dev.* 37: 75–83.
- Adiyodi, R.G., 1969. Protein metabolism in relation to reproduction and moulting in the crab, *Paratelphusa hydrodromous*: Part III - RNA activity and protein-yolk biosynthesis during normal vitellogenesis and under conditions of acute inanition. *Indian J. Exp. Biol.* 7: 13-16.
- Adiyodi, R.G., T. Subramoniam. 1983. arthropod-Crustacean. In: "Reproductive biology of invertebrates". Vol. I: Oogenesis Oosorption. Adiyodi K.G. and Adiyodi R.G. (Eds.). Wiley, chichester England. pp 442-495.
- Adiyodi, R.G. 1985. Reproduction and its control. In: *The Biology of Crustacea*, Vol. 9: Integument, Pigments, and Hormonal Processes. Bliss D.E. and Mantel L.H. (Eds.). Orlando, FL: Academic Press. pp 147-215
- Amin, O., L. Comoglio. 2002. Toxicidad del petróleo diesel en el primer estadio larval de la centolla (*Lithodes santolla*) y del centollón (*Paralomis granulosa*). *Rev. biol. mar. oceanogr.* 37(2): 139 - 144.
- Andrews, S.C. 2010. The ferritin-like superfamily: Evolution of the biological iron storeman from a rubrerythrin ancestor. *BBA-Gen subjects.* 1800(8): 691-705.
- Anger, K. 2001. *The biology of decapod crustacean larvae*. Balkema Publishers (Eds.). Netherlands. pp 420.
- Anger, K., G.A. Lovrich, S. Thatje, J.A. Calcagno. 2004. Larval and early juvenile development of *Lithodes santolla* (Molina, 1782) (Decapoda: Anomura: Lithodidae) reared at different temperatures in the laboratory. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 306(2): 217-230.

Anger, K. 2006. Contributions of larval biology to crustacean research: a review. *Invertebr. Repro. Dev.* 49(3): 175–205.

Arcos, F.G., E.P. Acuna-Gomez, J. Ruiz-Catillo, D. Medina, C. Olave. Sometido. Transcriptome pyrosequencing of the southern crab *Lithodes santolla*. *Mar genomics*.

Arcos, F.G., A.M. Ibarra, I.S. Racotta, C. Vazquez-Boucard, E. Palacios. 2003a. Hemolymph metabolic variables in relation to eyestalk ablation and gonad development of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquacul. Res.* 34: 749–755.

Arcos, F.G., A.M. Ibarra, C. Vazquez-Boucard, E. Palacios, I.S. Racotta. 2003b. Feasible predictive criteria for reproductive performance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*: egg quality and female physiological condition. *Aquaculture* 228: 335-349.

Arcos, F.G., I.S. Racotta, A.M. Ibarra. 2004. Genetic parameter estimates for reproductive traits and egg composition in pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*.236(1-4): 151-165.

Arcos, F.G., E. Palacios, I.S. Racotta, A.M. Ibarra. 2005. Genetic variance for ovary traits in *Penaeus (Litopenaeus vannamei)* shrimp at the onset of gametogenesis and family means correlations with reproductive traits in adults. *Mar. Biol.* 148: 339-346.

Arcos, F.G., A.M. Ibarra, M.C. Rodriguez-Jaramillo, E.A. Garcia-Latorre, C. Vazquez-Boucard. 2009. Quantification of vitellin/vitellogenin-like proteins in the oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein 1951) as a tool to predict the degree or gonad maturity. *Aquacul. Res.* 40: 644-655.

Arcos, F.G., A.M. Ibarra, I.S. Racotta. 2011. Vitellogenin in hemolymph predicts gonad maturity in adult female *Litopenaeu (Penaeus) vannamei* shrimp. *Aquaculture*. 316: 93-98.

Arcos-Ortega, F.G., S.J. Sánchez León-Hing, C. Rodríguez-Jaramillo, M.A. Burgos-Aceves, I. Giffard-Mena, Z. Garcia-Esquivel. 2015. Biochemical and histochemical changes associated with gonad development of the Cortez Geoduck Clam, *Panopea globosa* (Dall 1898), from the Gulf of California, Mexico. J. shellfish res. 34(1): 1-9.

Auer, P.L., R.W. Doerge. 2010. Statistical design and analysis of RNA sequencing data. Genetics. 185(2): 405-416.

Bell, T., D. Lightner. 1988. A handbook of normal penaeid shrimp histology. Allen Press (Eds.). Kansas. pp 87

Barnes, H., J. Blackstock. 1973. Estimation of lipid in marine animals and tissues: detailed investigation of sulphovanillin method for total lipids. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 12: 103–118.

Barki, A., I. Karplus. 2000. Crowding female red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, under small-tanks hatchery conditions: what is the limit?. Aquaculture 181: 235–240

Bauer, R.T. 1986. Phylogenetic trends in sperm transfer and storage complexity in decapod crustaceans. J. Crust. Biol. 6: 313–325.

Barki, A., T. Levi, G. Hulata, I. Karplus. 1997. Annual cycle of spawning and molting in the red-claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, under laboratory conditions. Aquaculture 157: 239-249.

Barham, D., P. Trinder. 1972. An Improved Colour Reagent for the Determination of Blood Glucose by the Oxidase System. Analyst. 97: 142-145.

Bayliss, H.O. 1984. Lipid histochemistry (Microscopy handbooks 6). Department of pathology, Guy's Hospital Medical School London Oxford University Press. Royal Microscopical Society. pp 68.

- Bembe, S.E. 2009. Reproductive physiology of the female blue crab, *Callinectes sapidus*: spawning induction and vitellogenesis. Tesis de Maestria. Faculty of the Graduate School of the University of Maryland, College Park.. pp 142.
- Boschi, E.E. 1979. Geographic distribution of argentinian marine decapod crustaceans. Bull. Biol. Soc. Wash 3: 134-143.
- Boschi, E.E., D.A. Bertuche, J.G. Wyngaard. 1984. Estudio biológico pesquero de la centolla (*Lithodes antarticus*) del Canal Beagle, Tierra del Fuego, Argentina. *contribution INIDEP Mar del Plata (Argentina)* 441: 1-74.
- Boschi, E.E., C.E. Fischbach, M.I. Iorio. 1992. Catálogo ilustrado de los crustáceos estomatópodos y decápodos marinos de Argentina. Frente Marítimo 10, 94.
- Bradford, M., 1976. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. Anal. Biochem. 72: 248–254.
- Braga, A.A., L.S. López-Greco, D.C. Santos, A. Fransozo. 2009. Morphological evidence for protandric simultaneous hermaphroditism in the caridean *Exhippolysmata oplophoroides*. J. Crust. Biol. 29(1): 34–41.
- Brusca, R.C., G.J. Brusca. 2005. Invertebrados 2da ed. McGraw-Hill Interamericana. pp 1005.
- Cain, A.J. 1947. A further note on Nile blue. Quart. J. Micro. Sei Micr. 88:383
- Calcagno, J.A., K. Anger, G.A. Lovrich, S. Thatje, A. Kaffenberger. 2004. Larval development of the subantartic king crabs *Lithodes santolla* and *Paralomis granulosa* reared in the laboratory. Helgol. Mar. Res. 58: 11-14.
- Calcagno, J.A., G.A. Lovrich, S. Thatje, U. Nettelmann, K. Anger. 2005. Growth of young-of-the-year lithodids, *Lithodes santolla* and *Paralomis granulosa*, reared at different temperatures. J. Sea Res. 54: 243-230.

- Campodonico, G.I. 1971. Desarrollo larval de la centolla *Lithodes antarctica* Jacquinot en condiciones de laboratorio (Crustacea Decapoda, Anomura: Lithodidae). An. Inst. Patagonia, Punta Arenas. 2: 181-190.
- Cárdenas, J.C., J. Gibbons, J. Oporto, M. Stutzin. 1987. Impacto de las pesquería de centolla y centollón sobre las poblaciones de mamíferos marinos de Magallanes, Chile. Amb. y Des. 3(1-2): 111-119.
- Carlisle, D.B., B.F. Knowles. 1959. Endocrine control in crustaceans. Chapter 6: Sex. Cambridge University Press, Cambridge
- Castille, F.L., L.A. Lawrence. 1989. Relationship between maturation and biochemical composition of gonads and digestive glands of shrimps *Penaeus aztecus* Ives and *Penaeus setiferus* (L.). J. Crustac. Biol. 9: 202–211.
- Cavalli, R.O., M. Tamtin, P. Lavens, P. Sorgeloos. 2001. Variations in lipid classes and fatty acid content in tissues of wild *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) females during maturation. Aquaculture 193: 311–324.
- Chang, E., J. O'Connor. 1983. Metabolism and transport of carbohydrates and lipids. In: Vol. 5 The Biology of Crustacea. Bliss, D.E., Mantel, H.L. (Eds.). Academic Press, New York. pp. 263–287.
- Chang, C.F., T.W. Shih, H.H. Hong. 1993. Purification and characterization of vitellin from the mature ovaries of the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Comp. Biochem. Physiol. 105: 6009-6615.
- Chang, C.F., F.Y. Lee, Y.S. Huang, T.H. Hong. 1994. Purification and characterization of the female-specific protein (vitellogenin) in mature female hemolymph of the prawn, *Penaeus monodon*. Invertebr. Reprod. Develop. 25: 185-192.
- Chang, E.S. 1997. Chemistry of crustacean hormones that regulate growth and reproduction. In: Recent advances in marine biotechnology. Figerman, M., R.

- Nagabushaman, M.F. Thompson. (Eds.). Oxford and IBH Publishing Co., New Delhi, pp 163-178.
- Charniaux-Cotton, H. 1985. Vitellogenesis and Its Control in Malacostracan Crustacea. *Amer. Zool.* 25: 197-206.
- Clarke, A. 1982. Lipid synthesis and reproduction in the polar shrimp *Chorismus antarcticus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 9: 81–90.
- Cohen, S., G. Petcoff, R.O. Freijo, E.L. Portiansky, C.G. Barbeito, G.J. Macchi, A.O. Díaz. 2015. Histochemical Characterization of Oocytes in the Pink Cuskeel (*Genypterus blacodes*). *Zool. Sci.* 32: 383-388.
- Comoglio, L., J. Goldsmit, O. Amin. 2008. Starvation effects on physiological parameters and biochemical composition of the hepatopancreas of the southern king crab *Lithodes santolla* (Molina, 1782). *Rev. biol. mar. oceanogr.* 43(2): 345-353.
- Daza, E., C. Vargas, L. Guzman. 2009. Seguimiento de crustaceos bentonicos de la Region de Magallanes. Informe final. pp 120.
- Díaz, P. 1988. Estudio de carnada óptima para la pesca de centolla, XII región, Chile. *Inf. Inst. Fom. Pesqu.* Santiago, Chile.
- Dubois, M., K. Gilles, J. Hamilton, P. Rebers, F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28(3): 350–353.
- Elorza, A., E. Dupré. 2000. Arquitectura del ovario de la langosta de Juan Fernández *Jasus frontalis*. *Invest. Mar. Valparaíso.* 28: 175-194.
- Fingerman, M. 1995. Endocrine mechanism in crayfish, with emphasis on reproduction and neurotransmitter regulation of hormone release. *Am. Zool.* 35: 68-78.

- Fingerman, M. 1997. Roles of neurotransmitters in regulating reproductive hormone release and gonadal maturation in decapod crustaceans. *Inv. Rep. Dev.* 31: 47-54.
- Flamini, M.A., C.G. Barbeito, E.J. Gimeno, E.L. Portiansky. 2009. Histology, histochemistry and morphometry of the ovary of the adult plains viscacha (*Lagostomus maximus*) in different reproductive stages. *Acta Zool.* 90: 390- 400.
- Fosatti, P., L. Prencipe. 1982. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin. Chem.* 28(10): 2077-2080.
- Gabe, M. 1968. *Techniques histologiques*. Masson (Eds.). Paris. pp 1113.
- Galois, R.G. 1984. Variations de la composition lipidique tissulaire au cours de la vitellogenese chez la crevette *Penaeus indicus* Milne Edwards. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 84: 155–166.
- Garcia, C.F., M. Cunningham, J.L. Soulages, H.A. Garda, R. Pollero. 2006. Structural characterization of the lipovitellin from the shrimp *Macrobrachium borelli*. *Comp. Biochem. Physiol.* 145B: 365-370.
- García-Guerrero, M., I.S. Racotta, H. Villarreal-Colmenares. 2003. Variation in lipid, protein, and carbohydrate content during the embryonic development of the crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). *J. Crustac. Biol.* 23: 1-6.
- Grande F., A. Utrera, J.C. de Oya. 1953. La reacción de la antrona en la determinación de los hidratos de carbono. *Rev. Clin. Esp.* 51(1): 17-23
- Guzman, L., E. Daza, C. Canales, S. Cornejo, M. Quiroz, M. González. 2004. Estudio biológico pesquero de centolla y centollon en la XII Región. Informe final. Fip 2002-15. pp 130.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.

- Harrison, K.E. 1990. The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans: a review. *J. Shellfish Res.* 9:1-28.
- Hernandez, M.B., P. Diaz. 1986. Análisis de la Pesquería de centolla. Diagnóstico Bio-Pesquero de la centolla XII región, 1985. Inf. Inst. Fom. Pesqu.s/n Santiago Chile. pp 43.
- Hickman, C.P., A. Larson, L.S. Roberts, H. I'Anson, D.J. Eisenhour. 2009. Principios integrales de zoología. 14a. ed. McGraw-Hill (Eds.). pp 917.
- Hinsch, G.W., M.V. Cone. 1969. Ultrastructural observations of vitellogenesis in the spider crab, *Libinia emarginata* L. *J. Cell Biol.* 40: 336-342.
- Hobbs Jr, H.H., M.C. Harvey, H.H. Hobbs III. 2007. A Comparative Study of Functional Morphology of the Male Reproductive Systems in the Astacidea with Emphasis on the Freshwater Crayfishes (Crustacea: Decapoda). Smithsonian Institution Scholarly Press, Washington D.C.
- Howard, A.W., C.S. Smith. 1983. Histological techniques for marine bivalve mollusks. NOAA Technical Memorandum NMFS-F/NEC-25, Woods Hole
- Hsieh, S.L., Y.C. Chiu, C.M. Kuo. 2006. Molecular cloning and tissue distribution of ferritin in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Fish Shellfish Immunol.* 21 (3): 279-283.
- Hui, J.H.L., S.H.K. Tiu, S.M. Chan. 2007. Molecular Characterization of the lobster (*Homarus americanus*) vitellogenin cDNA. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/126256674>.
- Humanson, 1972. Animal Tissue Techniques. Freeman and Co (Eds.). San Francisco.
- Ibarra, A.M., I.S. Racotta, G.F. Arcos, E. Palacios. 2007. Progress on the genetics of reproductive performance in penaeid shrimp. *Aquaculture* 268: 23-43.

Izuta, S., M. Kitahara, T. Hamaguchi. 2004. Regulation of eukaryotic DNA replication by proliferation associated protein, PA2G4, in vitro. *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf)*. 48: 285-286.

Joen, J.M., S.O. Lee, K.S. Kim, H.J. Beak, S. Kim, I.K. Kim, D.L. Mykles, H.W. Kim. 2010. Characterization of two vitellogenin cDNAs from a *Pandalus* shrimp (*Pandalopsis japonica*): Expression in hepatopancreas is down-regulated by endosulfan exposure. *CBP-Part B* 157: 102-112.

Kattner, G., M. Graeve, J.A. Calcagno, G.A. Lovrich, S. Thatje, K. Anger. 2003. Lipid, fatty acid and protein utilization during lecithotrophic larval development of *Lithodes santolla* (Molina) and *Paralomis granulosa* (Jacquinot). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 292: 61-74.

Knigh, J.A., S. Anderson, J.M. Rawle. 1972. Chemical basis of the sulfo-fosfo-vainillin reaction for estimating total serum lipids. *Clinical chemist.* 18(3): 199-202.

Kulkarni, G.K., R. Nagabhushanam. 1979. Mobilization of organic reserves during ovarian development in a marine penaeid prawn, *Parapenseopsis hardwickii* (Miers) (Crustacean, Decapoda, Penaeidae). *Aquaculture* 18: 373-377.

Lee, F.Y., T.W. Shih, C.F. Chang. 1997. Isolation and characterization of the female-specific protein (vitellogenin) in mature female hemolymph of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: Comparison with ovarian vitellin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 108: 406-415.

Li, J., Z. Guo, X. Gan, Q. Wang, Y. Zhao. 2010. Biochemical changes during vitellogenesis in the red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens), *Aquac. Res.* 41: 446-455

Li, K., C. Liqiao, Z. Zhou, E. Li, X. Zhao, H. Guo. 2006. The site of vitellogenin synthesis in Chinese mitten-handed crab *Eriocheir sinensis*. *CBP Part B* 143: 453-458.

- López Greco, L.S., F.J. Vázquez, E.M. Rodríguez. 2007. Morphology of the male reproductive system and spermatophore formation in the freshwater “red claw” crayfish *Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1898) (Decapoda, Parastacidae). *Acta Zool.* 88: 223-229.
- Lovrich, G.A., J.H. Vinuesa. 1999. Reproductive potential of the lithodids *Lithodes santolla* and *Paralomis granulosa* (Anomura, Decapoda) in the Beagle Channel, Argentina. *Sci. Mar.* 63: 355-360.
- Lovrich, G.A. 1999. Seasonality of larvae of Brachyura and Anomura (Crustacea, Decapoda) in the Beagle Channel, Argentina. *Sci. Mar.* 63(1): 347-354.
- Lovrich, G.A., J.H. Vinuesa. 1995. Growth of juvenile false southern king crab *Paralomis granulosa* (Anomura, Lithodidae) in the Beagle Channel, Argentina. *Sci. Mar.* 59(1): 87-94.
- Lovrich, G.A., S. Thatje, J. Calcagno, K. Anger, A. Kaffenberger. 2003. Changes in biomass and chemical composition during lecithotrophic larval development of the southern king crab, *Lithodes santolla* (Molina). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 288: 65-79.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193(1): 265-275.
- Marsh, J.B., D.B. Weinstein. 1966. Simple charring method for determination of lipids. *J. Lipid Res.* 7(4): 574-576.
- Matsumoto, T., A.M. Nakamura, K. Mori, T. Kayano. 2003. Molecular characterization of a cDNA encoding putative vitellogenin from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Zool. Sci.* 20: 37-42.
- McLaughlin, P., R. Lemaitre, C.C. Tudge. 2004. Carcinization in the Anomura – fact or fiction? II. Evidence from larval, megalopal and early juvenile morphology. *Contrib. Zool.* 73 (3): 165-205.

- Meeratana, P., P. Sobhon. 2007. Classification of differentiating oocytes during ovarian cycle in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* de Man. *Aquaculture*. 270: 249-258.
- Millamena, O.M., F.P. Pascual. 1990. Tissue lipid content and fatty acid composition of *Penaeus monodon* Fabricius broodstock from the wild. *J. World Aquac. Soc.* 21: 116-121.
- Minagawa, M., J.R. Chiu, M. Kudo, E. Ito, E. Takashima. 1993. Female reproductive biology and oocyte development of the red frog crab, *Ranina ranina*, off Hachijojima, Izu Islands, Japan. *Mar. Biol.* 115: 613-623.
- Mommsen, T.P., P.L. Walsh. 1988. Vitellogenesis and oocyte assembly. In: Vol. XIA. *Fish Physiology*. Hoar, W.S., Randall, DJ. (Eds.). Academic Press, New York. pp 347-406
- Mortazavi, A., B.A. Williams, K. McCue, L. Schaeffer, B. Wold. 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods*. 5(7): 621-628.
- Mossolin, E.C., S.L.S. Bueno. 2002. Reproductive biology of *Macrobrachium olfersi* (Decapoda, Palaemonidae) in São Sebastião, Brazil. *J. Crust. Biol.* 22(2): 367-376.
- Mourente, G., A Medina, S. González, A. Rodríguez. 1994. Changes in lipid class and fatty acid contents in the ovary and midgut gland of the female fiddler crab *Uca tangeri* (Decapoda, Ocypodiadae) during maturation. *Mar. Biol.* 121: 187–197.
- Mourente, G., A. Rodríguez. 1991. Variation in the lipid content of wild-caught females of the marine shrimp *Penaeus kerathurus* during sexual maturation. *Mar. Biol.* 110(1): 21-28.
- Nagaraju, G.P.C. 2007. Is methyl farnesoate a crustacean hormone ?. *Aquaculture* 272: 39-54.
- Nagaraju, G.P.C. 2011. Reproductive regulators in decapod crustaceans: an overview. *J. Exp. Biol.* 214: 3-16.

Nakagawa, H., A. Salam, S. Kasahara. 1982. Female-specific lipoprotein level in haemolymph during egg formation in freshwater shrimp. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 48(8): 1073-1080.

Neves, J.V., J.M. Wilson, P.N. Rodrigues. 2009. Tranferrin and ferritin response to bacterial infection: The role of the liver and brain in fish. *Dev. Comp. Immunol.* 33(7): 848-857.

Oshiro, J., G.S. Han, G.M. Carman. 2003. Diacylglycerol pyrophosphate phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1635: 1-9.

Osada, M., T. Takamura, H. Sato, K. Mori. 2003. Vitellogenin synthesis in the ovary of scallop, *Patinopecten yessoensis*: control by estradiol-17 β , and the central nervous system. *J. Exp. Zool.* 299A: 172–179.

Palacios, E., A.M. Ibarra, I.S. Racotta. 2000. Tissue biochemical composition in relation to multiple spawning in wild and pondreared *Penaeus vannamei* broodstock. *Aquaculture* 185: 353–371.

Palacios, E., I.S. Racotta. 2003. Effect of number of spawns on the resulting spawn quality of 1-year old pond reared *Penaeus vannamei* (Boone) broodstock. *Aquacult. Res.* 34: 427-435.

Palomo, S.T. 1960. *Histoquímica; Historia y aplicación*. Aguilar (Eds.) Madrid. pp 506.

Panouse, J.B. 1943. Influence d'ablantion du pédoncule oculaire sur la croissance de l'ovaire chez la Crevette *Leander serratus*. *C. R. Acad. Sci. Paris.* 217.

Pateraki, L.E., E. Stratakis. 1997. Characterization of vitellogenin and vitellin from land crab *Potamon potamios*: identification of a precursor polypeptide in the molecule. *J. Exp. Zool.* 279(6): 597-608.

- Paulus, J., H. Laufer. 1987. Vitellogenocytes in the hepatopancreas of *Carcinus maenas* and *Libinia emarginata* (Decapoda Brachyura). *Int. J. Inv. Rep. Dev.* 11: 29-44.
- Pechenik, A.J. 2000. *Biology of the Invertebrates*. Mc. Graw–Hill Higher Education, Fourth Edition. USA. pp 578.
- Qiu, Y.W., T.B. NG, K.H. Chu. 1997. Purification and characterization of vitellin from the ovaries of the shrimp *Metapenaeus ensis* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae). *Inv. Rep. Dev.* 31(1-3): 217-223.
- Quackenbush, L. S. 1989. Vitellogenesis in the shrimp *Penaeus vannamei*: In vitro studies of the isolated hepatopancreas and ovary. *Comp. Biochem. Physiol.* 94B: 253-261.
- Quinitio, E.T., A. Hara, K. Yamauchi, T. Mizushima, A. Fuji. 1989. Identification and characterization of vitellin in a hermaphrodite shrimp, *Pandalus kessleri*. *Comp. Biochem. Physiol.* 94B: 445-451.
- Quinitio, E.T., O.M. Millamena. 1992. Ovarian changes and femalespecific protein levels during sexual maturation of the white shrimp *Penaeus indicus*. *Isr. J. Aquac. Bamidgeh.* 44: 7-12.
- Racotta, I.S., E. Palacios, A.M. Ibarra. 2003. Shrimp larval quality in relation to broodstock condition. *Aquaculture.* 227: 107-130.
- Ravi, R., M.K. Manisseri, N.K. Sanil. 2013. Ovarian maturation and oogenesis in the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus* (Decapoda: Portunidae). *Act. Zool. (Stockholm).* 94: 291-299.
- Raviv, S., S. Parnes, C. Segall, C. Davis, A. Sagi. 2006. Complete sequence of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) vitellogenin cDNA and its expression in endocrinologically induced sub-adult females. *Gen. Comp. Endocrinol.* 145(1): 39-50

- Reppond, K.D. 2009. Biochemistry of red king crab (*Paralithodes camtschaticus*) from different locations in Alaskan waters. U.S. Dept. Commer., NOAA Tech. Memo. NMFSNWFSC-102, pp 16.
- Retamal, M.A., H.I. Moyano. 2010. Zoogeografía de los crustáceos decápodos chilenos marinos y dulceacuícolas. Lat. Am. J. Aquat. Res. 38: 302-328.
- Reynolds, J.D. 2002. Growth and Reproduction. In: Biology of freshwater crayfish. Holdich D (Eds). Nottingham: Blackwell Science: 152-191.
- Roca, P., J. Oliver, A.M. Rodríguez. 2003. Bioquímica; Técnicas y Metodos. Helice, Madrid. 348 pp
- Roe, J.H. 1955. The determination of sugar in blood and in spinal fluid with anthrone reagent. J. Biol. Chem. 212: 335–343.
- Rodríguez-González, H., A. Hernández-Llamas, H. Villarreal, P.E. Saucedo, M. García-Ulloa, C. Rodríguez-Jaramillo. 2006. Gonadal development and biochemical composition of female crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae) in relation to the Gonadosomatic Index at first maturation. Aquaculture 254: 637-645
- Rodríguez-Jaramillo, C., M.A. Hurtado, E. Romero-Vivas, J.L. Ramírez, M. Manzano, E. Palacios. 2008. Gonadal development and histochemistry of the tropical oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) during an annual reproductive cycle. J. Mar. Shellfish Res. 27: 1129-1141.
- Rodríguez-Moscoso, E., R. Arnaiz. 1998. Gametogenesis and energy storage in a population of the grooved carpet-shell clam, *Tapes decussatus* (Linne, 1787), in northwest Spain. Aquaculture. 162(1-2): 125-139.
- Rotllant, G., G. Guerao, N. Gras, A. Estévez. 2014. Larval growth and biochemical composition of the protected Mediterranean spider crab *Maja squinado* (Brachyura, Majidae). Aquat. Biol. 20: 13-21.

- Rosa, R., M.L. Nunes. 2002. Changes in organ indices and lipid dynamics during the reproductive cycle of *Aristeus antennatus*, *Parapenaeus longirostris* and *Nephrops norvegicus* (Decapoda) from the portuguese south coast. *Crustaceana*. 75 (9): 1095-1105.
- Roustaian, P., M. Kamarudin. 2001. Biochemical changes in freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) during larval development. *J. World Aquac. Soc.* 31: 53-59.
- Ruppert, E.E., R.S. Fox, R.D. Barnes. 2004. *Invertebrate zoology: A Functional evolutionary approach*. 7th Edition. Thompson. Brooks/Cole. USA.
- Ryazanova, T.V. 2005. Histopathological Changes Associated with Shell Disease in the Red King Crab *Paralithodes camtschaticus* (Tilesius, 1815). *Russ. J. Mar. Biol.* 31(6): 359–366.
- Sánchez-Paz A., F. García-Carreño, A. Muhlia-Almazan, A.B. Peregrino-Uriarte, J. Hernández-López, G. Yepiz-Plascencia. 2006. Usage of energy reserves in crustaceans during starvation: Status and future directions. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36: 241-249.
- Saout, C., C. Quéré, A. Donval, Y.M. Paulet, F.F. Samain. 1999. An experimental study of the combined effects of temperature and photoperiod on reproductive physiology of *Pecten maximus* from the Bay of Brest (France). *Aquaculture* 172: 301- 314.
- Schenk, P., L. Carvalhais, K. Kazan. 2012. Unraveling Plant-Microbe Interactions: Can Multi-Species Transcriptomics Help?. *Trends Biotechnol.* 3: 177-84.
- Schvezov, N., G.A. Lovrich, F. Tapella, M.C. Romero. 2013. Daily variations of the antioxidant defense system of the lithodid crab *Lithodes santolla*. *Comp. Biochem. Phys A.* 164: 605-611.

Sernapesca, 1997. Régimen de acceso, veda biológica y tamaños mínimos que regulan la extracción de los principales recursos pesqueros del país. Ministerio de Economía y Reconstrucción, Chile.

Sernapesca, 2004. Suspensión temporal del acceso a la pesquería de centolla de la XII región, 2005 – 2009, Chile.

Sernapesca, 2012. Anuario de desembarque, in: <http://www.sernapesca.cl/> (Ed.), Chile.

Subsecretaría de Pesca y Acuicultura. Gobierno de Chile 2014. Informe Técnico (R. Pesq.) N° 208/2014 Modificación Veda Biológica Centolla (*Lithodes santolla*), XIV, X, XI y XII Región, año 2014. pp 41

Serrano-Pinto V., M.G. Carrisoza-Valenzuela, M. Ramírez-Orozco. 2005. Determination Site of Vitellogenin Synthesis in Freshwater Crayfish *Cherax quadricarinatus* at Different Maturation Stages Females. Invest. Mar. Valparaíso. 33(2): 195-200.

Sievers, H.A., N. Silva. 2006. Masas de agua y circulación en los canales y fiordos australes. In: Avances en el conocimiento oceanográfico de las aguas interiores chilenas, Puerto Montt a cabo de Hornos. Silva, N., Palma, S. (eds.). Comité Oceanográfico Nacional-Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso. pp. 53-58.

Smija, M.k., A.R. Sudha-Devi. 2015. Oocyte Development and Female Reproductive Cycle in the Freshwater Crab *Travancoriana schirmerae*. Turkish J. Fish. Aquat. Sci. 15: 691-702.

Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goetze, B.J. Olson, D.C. Klenk. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 150(1): 76-85.

Snedecor, G.W., W.G. Cochran. 1989. Statistical Methods. 8th Ed. Ames: Iowa State Press.

- Spaargaren, D.H., P.A. Haefner Jr. 1994. Interactions of ovary and hepatopancreas during the reproductive cycle of *Crangon crangon* (L.): II. Biochemical relationships. *J. Crustac. Biol.* 14: 6–19.
- Sui, X., P.D. Kiser, T. Che, P.R. Carey, M. Golczak, W. Shi, J.V. Lintig, K. Palczewski. 2014. Analysis of Carotenoid Isomerase Activity in a Prototypical Carotenoid Cleavage Enzyme, Apocarotenoid Oxygenase (ACO). *J. Biol. Chem.* 289(18): 12286-12299.
- Surot-Navarro, A. 2006. Cambios fisiológicos y bioquímicos durante el desarrollo temprano de *Lithodes santolla* (Molina, 1782) (Decapoda: Lithodidae) y *Petrolisthes laevigatus* (Guérin, 1835) (Decapoda: Porcellanidae): una comparación dentro del infraorden Anomura. Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. pp 76.
- Teshima, S., A. Kanazawa. 1978. Release and transport of Lipids in the prawn. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 44: 1269 -1274.
- Teshima, S., A. Kanazawa. 1979. Lipid transport mechanism in the prawn. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 45(10): 1341 -1346.
- Teshima, S., A. Kanazawa. 1980. Transport of dietary lipids and role of serum lipoproteins in the prawn. *Bull Jap. Soc. Sci. Fish.* 46: 51- 55.
- Teshima, S., A. Kanazawa, S. Koshio, K. Horinouchi. 1989. Lipid metabolism of the prawn *Penaeus japonicus* during maturation: variation in lipid profiles of the ovary and hepatopancreas. *Comp. Biochem. Physiol.* 92B(I): 45-49.
- Tiu, S.H.K., J.H.L. Hui, A.S.C. Mak, J.G. He, S.M. Chan. 2006. Equal contribution of hepatopancreas and ovary to the production of vitellogenin (PmVg1) transcripts in the tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture.* 254(1-4): 666-674
- Thongda, W., J.S. Chung, N. Tsutsui, N. Zmora, A. Katenta. 2015. Seasonal variations in reproductive activity of the blue crab, *Callinectes sapidus*: Vitellogenin

expression and levels of vitellogenin in the hemolymph during ovarian development. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 179: 35-43

Tom, M., M. Fingerman, T.K. Hayes, V. Johnson, B. Kerner, E. Lubzens. 1992. A comparative study of the ovarian proteins from two penaeid shrimp, *Penaeus semisulcatus* and *Penaeus vannamei*. *Comp. Biochem. Physiol.* 102: 483-490.

Tsukimura, B. 2001. Crustacean Vitellogenesis: Its Role in Oocyte Development. *Amer. Zool.* 41: 465-476.

Tsutsui, N., I. Kawazoe, T. Ohira, S. Jasmani, W. Yang, M.N. Wilder, K. Aida. 2000. Molecular Characterization of a cDNA Encoding Vitellogenin and Its Expression in the Hepatopancreas and Ovary during Vitellogenesis in the Kuruma Prawn, *Penaeus japonicus*. *Zool. Sci.* 17: 651-660.

Varadarajan, S., T. Subramoniam. 1980. Histological changes during vitellogenesis in the ovary of the hermit crab *Clibanarius clibanarius*. *Proc. Indian natn. Sci. Acad.* 46(5): 645-651.

Vázquez-Boucard, C., H.J. Ceccaldi, Y. Benyamin, C. Roustan. 1986. Identification et caractérisation de la lipovitelline chez un crustacé décapode nanantia *Penaeus japonicus* (Bate). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 97: 37-50

Vázquez, F., C. Tropea, L. López-Greco. 2008. Development of the female reproductive system in the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). *Invertebr. Biol.* 127(4): 433-443.

Vinuesa, J.H. 1977. Aportes al conocimiento de los crustáceos decápodos de Tierra del Fuego, con algunas observaciones zoogeográficas. *Physis, sec, "A"* 36: 9-19.

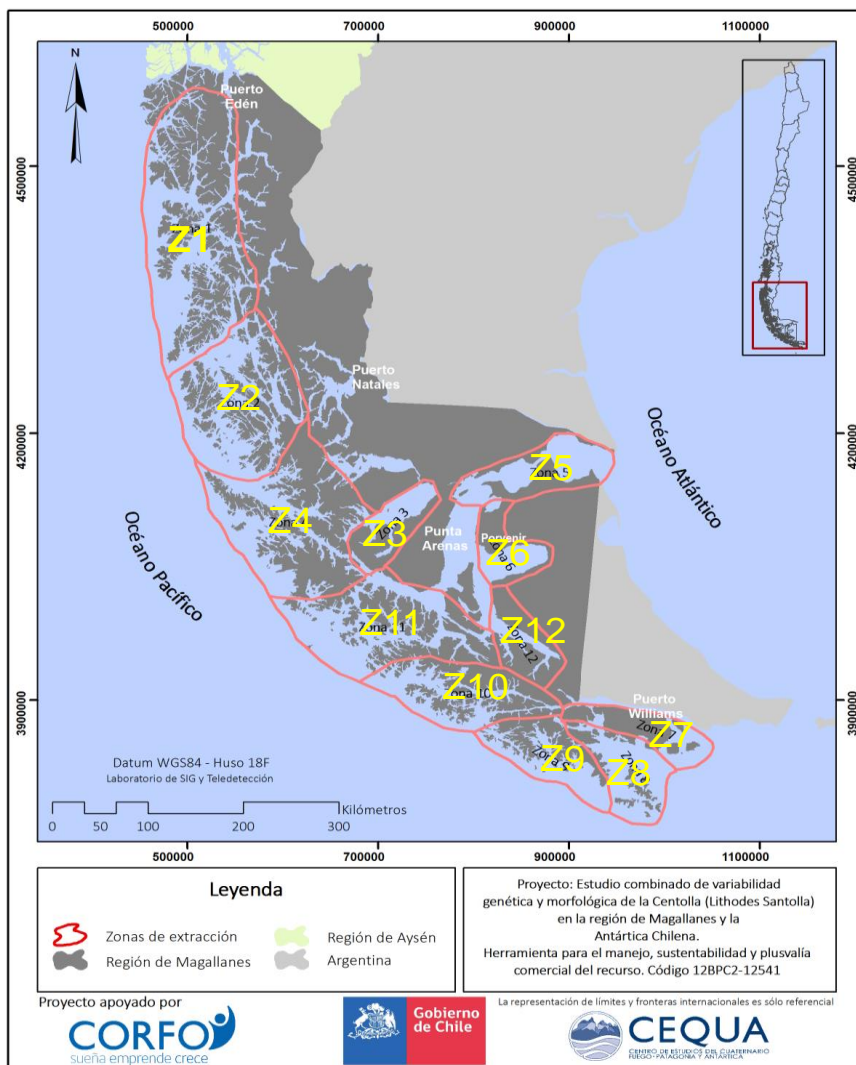
Vinuesa, J.H. 1982. Biología de la reproducción y el desarrollo embrionario y larval de la centolla, *Lithodes antarcticus* *Jacquinet*, en el Canal Beagle, Tierra del Fuego. Universidad de Buenos Aires.

- Vinuesa, J.H., R. Lombardo. 1982. Observaciones sobre el crecimiento en la muda de hembras adultas de centolla, *Lithodes antarcticus* Jacquinet. Physis sec."A" 40: 69-74.
- Vinuesa, J.H. 1984. Sistema reproductor, ciclo y madurez gonadal de la centolla (*Lithodes antarcticus*) del Canal Beagle. Contr. Inst. Nac. Inv. Des. Pesq. 441: 75-95.
- Vinuesa, J.H., L. Ferrari, R.J. Lombardo. 1985. Effects of temperature and salinity on larval development of southern king crab (*Lithodes antarcticus*). Mar. Biol. 85(1): 83-88.
- Vinuesa, J.H. 1990. Biología y pesquería de la centolla (*Lithodes santolla*). Atlantica, Rio Grande 13: 233-244.
- Vinuesa, J.H., P. Balzi, G.A. Lovrich. 1998. La centolla (*Lithodes santolla*) del Golfo San Jorge. Contrib. Cient. CADIC. Ushuaia. pp 32.
- Villegas, C.T., A. Kanazawa. 1980. Rearing of the larval stages of prawn, *Penaeus japonicus* Bate, using artificial diet. Memoirs of the Kagoshima University Research Center for the South Pacific, 1(1): 43-49.
- Vogt, G., V. Storch, E.T. Qunito, F.P. Pascual. 1985. Midgut gland as monitor organ for the nutritional value of diets in *Penaeus monodon* (Decapoda). Aquaculture 48: 1-12.
- Vogt, G. 2002. Functional anatomy. In: Biology of freshwater crayfish. Holdich D. (Eds). Nottingham Blackwell Science. pp 53-151.
- Wang, L., Z. Feng, X. Wang, X. Wang, X. Zhang. 2010. DEGseq: an R Package for Identifying Differentially Expressed Genes from RNA- Seq Data. Bioinformatics 26: 136-138.

- Ward, D.G., B.S. Middleditch, S.R. MissJer, A.L. Lawrence. 1979 Fatty acid changes during larval development of *Penaeus setiferus*. Proc. World Maricult. Soc. 10: 464-471.
- Wilder, M.N., T. Okumura, Y. Suzuki, N. Fusetani, K. Aida. 1994. Vitellogenin production induced by eyestalk ablation in juvenile giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and trial methyl farnesoate administration. Zool. Sci. 11: 45-53.
- Wilder, M.N., T. Okumura, N. Tsutsui. 2010. Reproductive Mechanisms in Crustacea Focusing on Selected Prawn Species: Vitellogenin Structure, Processing and Synthetic Control. Aqua-BioSci. Monographs 3 (3): 73-110.
- Xie, S., L. Sun, F. Liu, B. Dong. 2009. Molecular characterization and mRNA transcript profile of vitellogenin in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. Mol. Biol. Rep. 36 (2): 389-397
- Yano, I. 1988. Oocyte development in the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. Mar. Biol. 99: 547-553
- Yang, F., H. Xu, Z. Dai, W.J. Yang. 2005. Molecular characterization and expression analysis of vitellogenin in the marine crab *Portunus trituberculatus*. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/62728524>
- Zar, J.H. 1999. Biostatistical Análisis. Fourth edition. Prentice-Hall (Eds.). Inc. New Jersey, USA. pp 663.
- Zhang, D., K. Jiang, F. Zhang, C. Ma, Y. Shi, Z. Qiao, L. Ma. 2011. Isolation and Characterization of a Ferritin cDNA from the Mud Crab *Scylla paramamosain* J. Crust. Biol. 31(2): 345-351.

12. ANEXOS

Anexo I. Zonas de muestreo



Zona 1: Islas y canales comprendidos entre la costa sur de las islas Wellington y Mornignton, costa oeste de la península Wilcok, isla Esperanza, isla Diego de Almagro y Jorge Montt (Guarello).

Zona 2: Incluye canales adyacentes al canal de sarmiento, a la isla Maldonado a la bahía Parker y al sector del grupo Cuarenta Días e isla Conejo.

Zona 3: Cubre el sector del seno Otway en la costa occidental de la península de Brunswick y costa sur de la isla Riesco.

Zona 4: Sector de la isla Desolación (canal Abra) y el sector de seno Profundo i la isla Rice Trevor.

Zona 5: Sector oriental del Estrecho de Magallanes incluyendo puerto Zenteno, bahía Santiago y puerto Felipe.

Zona 6: Incluye el sector de gente grande y Santa María.

Zona 7: Sector del canal del Beagle (bahía Virginia, bahía Estrella, punta Gusano y Ukika)

Zona 8: Sector del canal Canacus, la península Hardy, el sector de Wollaston y la bahía Windhond.

Zona 9: Sector isla Thomas y bahía India.

Zona 10: Sector del seno Luisa y del canal Barros Merino y Brazo Inútil.

Zona 11: comprende islas y canales entre la costa sur de la península Brunswick, seno Agostini, seno Bluff, canal Cockburn, isla Carlos y costa sur de isla Santa Inés.

Zona 12: Comprende la zona de puerto Yartou, seno Almirantazgo y bahía Brookes.

Anexo II. Secuencia consenso de vitelina y ubicación de los cebadores diseñados.

5'-
 TGGTGAGYGYGGDCCAYCAT GACYAMVCRACAGYCTYMRCTRCTGGCCSTRRCGGCBGCTGCTGYTGCRCRCGCTAYGGARRYRCCRYCMDCKHTGY
 TCSACGGAGTRCCSDTKGCGYCKGCCAARYTVKCYTTCAYYCCRGGAARACYTAYTCTVACRMHTAYWCWGGARAGTCVMHWGTDACGCTGAAAGGYGTGGA
 WCCMC GCVVMWGTGKASACMMRATGGGARRAAMWWRTRCTGHTGACKKKKCTCRGYCCRTGCGAYVTRGCMVTCCTTCAARGRCWCHAAGGTGGAYGGCR
 AGRCMGGWYYGYCTGGSKMRRYAWGYTGGAGARGTAYCCRYTRGTGGTGCKATGACCGAYGGMCGAGTGCAGCGSGT **TGCAGTCATCCCGAYGACGA**YM
 CMTGGGCRATYAAACATGAARAAGGGYGTGYHTCRRCYTRCAGATHAGYCTGCCGTCYCTCCAYCAGCAAYTCWGGATCAAYYTHACRGAGACRGACGTG
 STGGGRACSTGCCCKACSYRCTAYGAGGTMSARRSHGAWGGYKCCARRGTRSTRGTS **AGAAAGGAGAAGAACCAYCG**YTTCTCYMR **SARCR**TTAYSCWACCC
 MGAYGAGAYKVAYHTGCCRYRKTGAWGGGHCCSYTGCCATSCAGGAGTCRYRRT **CRRK**KTGYASRCAAGAGRTYACAGYGGCATCATCTCYCAGTSRWGT
 GTGARGACAAGAARGTSRTRARGCCAKCDTAYGGMAYSTACAAGTWYTSARGCM **AGCARG**AGTCAACAHRMRRCTYACYTCVAGYASGYYYCYRCNCCA
 GAYAYCRTYTCMCGCATYKSTCAGRRYSASCTRGWRCCARRMGYCTSCKYTAGACTAYGAR **MCBSC**MAAGAAGGAKCCSWCHCTKTRCCRSAGCTGGAGCA
 AACVCTSASRYATCTBTGYGASATCACC AVAGAYGRRRTTSARGCYSATRYGCGYMSASYTGRSSAARGCCGTSMACCTSATGCGBCKCA **TCCRSW**CAARGY
 TTCAAKGAWATCTAYRCAAAGRTSCRCARYAARCAGATATGTCRCARCAAVACARGYTBAGAGYMTSTWYWWWSGAYGCGATYGCYTYTYGTCAYGAF **CCHGAR**
 TCRGTYMYWRKATGGYMAARGARCWGGYKARGGAMGRRCCACYGDRCTCKHGCTGCCMTYATYTCWRCSGSW **TTYTACCTCGTGCCTCGCCCT**KAYRTGR
 MRGCMRTTCRAGCCTWAGCCWYBTBTARGKCYR **YGAAC**CCDABCTRWBSBTCDDGCRARYTGCCWGCYCTCCATGGTAAACASRTRACTGTCCWAAAYAA
 MCCACAMTYAYRABGARDCTMMTGARRARCCTR **SYRCW**GGCKMTSAAARCARAWGATYSAGRAMGAYCTSKCNKCYTCWARYARHGAGGASWCYSARRRR
 MAGRCYTKKCYGCCY **TCAARAGCCTGGCAACATGGG**BGTCATGACMCMGAKRYRGGYASRWRSRTYCKCTAYATGSAVARSGARMAMAARAARATSAR
 CRHHGCGYTRGCHGCTGYACAAGCYTYAGGYTSWCCRAGTGMAMCGYSHGGTGACVCARAARYTHGTYASTWTGCCSTCGHCCNRRVARMACACRGAR
 GTTMGMATTGWGCTYATCTRRCDGCASTTCGCTGYGYMRAMTAYGARGACYTSSARVMHATYGTSAHAAGATCTCCKWYGARGAAAACACBCARGTTCTGG
 GTTYATCYTGAGYMAYYTKMTRAACYTRCAAVAGWCVRAYGCVCCMGRAA **SAPASK**CTKCGCTMCMTGACRAAYATYTYNTKCCCSAWRATTTTGAGVS
 WGACMTYAGRAAGTAYTCMRMAACMTDGACYTBTCTAYTTCKCCSMATCCMTYGGY **STYGG**TGCBGRRKTRGAGTCCAACMTKATCTAYGYNCHGGCTCCW
 TSHTCWCWCGYTCYTKGDYDACYSTACTGCAGCTSY **GATGSAACGGGATYTC**RTBAACWTHGSAGADRTYGGMSTCGYSTYAGGGMTGGAACCR
 ATMMTYGCTCARMTYTKGGACCTGCWRGYTACYTYAAGAMRTCSAGYTYARYAARATSTMMWATGAYCTVRTCTCCTTYATCMAAMARMAYTGAGYAMRATT
 MARSADGARCTRGASGYKCBATMMRGAGAGRAGRWHSTWGACKATGCARCTMTWGARAGYATSWTCASCAARCTSTAYGGBCCYCBMTGGAVMKKTC
 ARGCMGAYKTYTYTGCHGYTYHTGGGWARGARATMARCTRTGSCTCYTYGTCTYADMBCTGCAGGACATCAARYDSAVSMCTTRTRGAWRMYTYTRKY
 MGVTRCYGAWDSRRWAKCTSADBAVHHTGAARARCVTGRAYCTRGACWHDYRSMRRGCMRYWCAVYTGGRSTGGAYTACTCCTMCCRACYATTAGGGCA
 CRCCRCTSAAGATRAMVWGGARRCNTRGYGTAGSWGGAATCMARWTVARACVAAYCTMAAYGGVSYWYTYCTCKGRBSARRSARRYRSCGRWRWWWAH
 TBAARATYTRCCRWYTYTCWGTGRAGRRCRAYGYWYATYTGCTAYGAYGCTACRKTMCMAAGAGYGGRT **TCAAGATGAACRCCACYGT**YTCNAGCARC
 AAYGGBSTCGCMATCARGTRRRRYKCCARAGYRGMAGASVDSARATYARGTSGACMTYCCCRASAAGAT **GAAAT**MATTCRMGTWCVAGYGARCKTW
 CTYAWGAARSRHMBARRACAYCAGCCRGAAHCAAGRTYTGSCRCMTTCCATGCARGACVYHAGADTCC **RRRR**WY **KKCR**TGCTTYACTRSMCTYAGT
 CRKTGYTYGGYMTAAGATGTGCTAYGACVTCRAYGTHCCRGACRMTTCCGWGCTAAYKCRWCTRCCMYTGGMKCYCCARYHCTKGYBABRSYBMHVTCAA
 CAARAYWGARTCCWCCATMAMGGRTACAAGATWGCYGYAVHRCASRRCRMSAMVCARGAYAAAAARTATGSMKSYAAAGTYTCYGYRGGSTCRKCTT
 CACCSAARGARKCMRAYGTDGARGTHMWCCWHAAGARASASRGGAWTCKTAYMTTGCYGMDRTCAARCTCVWGTCRBCYSTYWMYMRGGCRAKRYARGR
 TBVDCYTRTYAACARRCCYGARCWVAWRASYBTCSARRCTGAHKTBKCBYTYWHSAMVRRHRGCRKSGADTTYDYMAAAGBVWMTADARTWGASAYMAAGRWA
 WCGHVYRHWNVDRDATGSCAWSARRTACGANAYRATRTMTWTKKBAGYCCCWCSRRBMRMAYBTCYSASSAGTCCMARATVTTACWGSRVWRCTMAHAHWKR
 MNYWCAKGDYDCCTWRKRTRVTRTGSAAHYWVKGSYRARACSRARAACRDYTHADKARTACWYCYTYCAGKHTTVADRYGKYGKWDWSTKSAAGYAS
 TACRMYRDBRTKSCMTVCCWVYHGRGTMGRMMAMTYKGARCTSRHRRYGVHATYDMYRGTGGAWGDTSRHWDBCTTCKTCCGYRRBWCRRRRGMRTYV
 RGYCARRRVRGWRATATYTKYCNRYCTYCMRVSTGBWCCRCVADRVRSRGWGHTSATTRABHTMMARRBTGACMTCBMYTYCRDKGRASRYMYGSWGT
 KRAYTTYRWRSMRCAMWTSYHRYRAHGCAAGWTCGGVSARRCMSARTACRAGTBSWRCRAGDGRITVHRTRSCARGAGASVARGRDWGSRRYMASYHTG
 CARBTKACWCGYVMRWBKGACAACKTGAAGYTYTYSAGATMSNBGYVAGARSAYKYRSABRAGATSAWGTTYMTKTYWRGGTYSASDTSYNGRGTWYAT
 DSBRCWATYAAARTGRBYGCMVGGDYRWRCRRACARGRW SAGGRCTACRWKGYHGADGCMRYTRTCMTKYRYRGASRMCAAAVYVVTGTMARCTDCAVGG
 DCCTGYACYTYWYRBAHWACACWRMCRCTYRCVAARBWGSARCYAACATYAARATCAACRAYNTATCARTKBRTHTHYKYHYWGARTWCSAARAARVMAA
 GSAMWNTKBKTYMTGGTAGMTAAAGAAGSRSMRSAARTCTYBKRCYBTRHW **YBMD**ACVYWAARWYCCAKYCYCKARRSMYBYTSMTRSAGGCCRRG
 VTRHAHVTRCCHMTKYYSYKYGAYGSMRV SAYDGASRTSYRTCASCC **ARARY**TRTYCACRYCASCACMRACMYCTSYKGYTRCCVMRBTCTCYCTTYCCCA
 CGBAGRRTYAAGGCYTCMYSYAYRTCAACTKSRVCMRVAARMAGGSVCA **AGATGATGCTGCTCTGGAA**YGCYACMAKGAWKDCTCMCAAAAGATYGCYSTNGA
 YGYCRHYACTRTGCCDGAGAGYGGMAGKCMHRCTSRWKCAAMYMTWSACRYAARSTMAYGSTYHTGRAYMRRRCYTRCMACBYBAWYRYKAARGTRGWGGY
 GCCRTTCTGSTGCRSCRYSAYSGRAGARARACAGYATHSANATGRASGTRSASRCHGMVSRRAAGAAMTGGATGCTKSAGRTSGSNRYMAGMRMCRDGR
 KRRCWRCSYGCCWBGYASBTYACYTTAAGAGYRYMAYRRCAAAYAACTACCRMCTGACTMWRDRDBTCMRKKKGCRCCKBCTYGMYSRVYMHYWSKGGT
 TCSASGYYSARASYRRMAYSASRTWMATYKCTCCRSWRAAYMRKCRBKCRCDVTTYDHDVTRMAKGYCAARMACSASWDBWMMWMSARCSRCAAYCATYYA
 WYTYRYGAYGAAGYTCRACSCCGRGYAYGSARMSSCCRHTGAAGRTBRDYTWCTCRHYKGARAACMAGGACTRTTCTBAYRKMAMCAARBKSWRAGYGARV
 TBRRCRGTCMHRARACGSTRTYVBBTGGCAGCTGGARAYCTWYCCMRWGGYGGARTWMMARMVCTKRRAVAWTRCYWTCGAYMTACMDGCVYTYMRVRYWY
 TWSTGARRDYMTGASCASCATKGTGGYKTCGARGMRGCWCWYHTTGSYACCTCYGCCTAYSRRKACCAKAGRARBRCTACVGTMMHRSTAYASMMR
 DKCYHYCHWSRCAYSACTCSTMMKRATTGMRYMBCCVTCGCCRCMGTGARGCCSAKRCASCCYWCCTCYCCYCYAWGRYGGGCWTRAGKTSTAYCSR
 AACAGRRSTGMRRGYARSMAAGTAYGAGRTGKCYGGYAGTACMKBGAMARCHWGTGGRGMGMMAWSTCCRVYTKSADGGBMRAATGAGYCATCCVADR

YTGKMMRRGAYWTGACRGYRGYBRTVGAGTMYRCWRS DAGCRGYRRYRGKRCMRCARGAWCHTTYGARYTGGAYRTCTTCCCTRAYRCR **GCTGACAARATCA**
CYGGYTCYYTMASTCMRTYCTKYSRGCWAACAAYACCRTC SYCATCGAGGCYAAAYCTTTYDCHAGGRTRYTG CAGGTGAARCCYARAGTGMRTRTGGARGYBT
 CCTGGGCWGCWCACACYGCKGCMTTAATTTTCWCCTTCMRHRAGACTCCSWYNTCRM MRGARTCRYTMRARGWMMRBKCCAARTAYGACCRWATYTCSARRM
 ABYACKCRGCDGTGACCTTCCWHYTRGC **VRSWGAPGG**BSBYCYRYGRTGGACGTGTCYGGCGTRRTRGARCCDCGCHAMGGBCYYMSTGTGMYGGCTTYG
 CRCTKMKRRSYAAYDSRCRHACSTCWMTYCTYRGVRACTTYRYGTYAAYTCVACYGSTGYARRCCTRYSTTCCCTCGARVTRGYWWTNAMSAAARSMSRRYKMS
 ARAAVRTCTAYAARGCYRMKVTYGGHMMWCVGWYVCCYTACAAAGCHSRAATMAGYCTYKCYGAGASHGACARRTHCMAMAYVTGGKABRARTACATBTCBMT
 RTYRRYATYVRDCTKMRAC YCCWYRYRCATYAAGATCGMCWHTRARTWYARRSMKRASSAAAYGRSANMWHGTGARGGAYYSKTRDTGARTGAHGTGKAYCG
 ARTKASKGAGGMGKBTTKWYRTGGACGGAYCRVSTSTRYRVSGARRTRASCVCARGCHRSHCAGRMGGHGTYSMMTTCYBCRCYSYTVARATMMRBMAS
 TSNYVSARGAGRTHMRDSRVGABATYDKKRAKATYAYVBMGAYBTGMTSBACARYGAYMTYBKGHVYRWKWKGRAVRMHKSRWRSARMTYCTRYRMRGVCCA
 WCDGYCACMTTYRTSAVRRAGKYSWYTWCCARWYMYTGMRRVCATGGMMAHDYGSAAAGRGARTKKGC DRKYDVTRYVDTVSARCARMTMMTGGMAYTSA
 ARVAMYAYTKBRRRYMBRYWATCAACRARATHWNTSAAGCWRYGRRMSARRTBKVHCRSTGGRTMRMABACKGGYGAGGAGYCKGARATDGTGCGTGGHTGVT
 GAGGANBTSSAAMGAWCWGYCWKSTAYCRSNTDMTHMAGACHSARTRATCSAKCCYMTCARRGARAHSTACCCMCARSMGTACCAGGYWCBWRWRGASGK
 YKGYAAGGTYAYDKMCWCYTCMGBMRBGACYTGMKYATSWYGMARCSAARSTYKGGCBTCGCCACKRSTSMRCAGVNTTAKYCD SARRATYGHHRMYTTR
 WSYMAGSMKRAMAYVHTGARRYGACDYTGARTGGYKGSWSAGCCARKTGP **GCAGMGY**VTVTCAYCATSGCCCCMGARCCGGYRWRWACCRCYTYGGS
 ATTCAAATYCCRCTVAYCGNCCYRTCTAYCTCYCWYKCAASTKSTGAACATGACGATGCASATGCARTCSCKCYKWKHTCWCRVARAARMTSCTHCTGKCHK
 CHGAKVBMYYMYRCCBATCYCMKYSAVSAARRTTWTGRARACYTAYWAYSVBTTGGRTSCC **IRSSAAY**YDTCCRMMTYVSYWBYVHCCTTHAACCRDTCTGCCY
 WKGKGGTRRSHGACTGARATTYACHTTYGACGGK **GTTCTYCTMCGCATGCCTCGCTCAY**SCTGYAAGGKTRCT-3'

PRIMER	TAMANO (pb)	ND*	Tm(°C)	%GC	PE (pb)
5-TGGTGAGYGYGGDGCCAYCAT-3' F	21	4	68.7	52.4	1237
5-AGGGCGAGGCACGAGGTARAA-3' R	21	1	63.4	57.1	
5-AAGAAGGAGAAGAACCAYCG-3' F	20	1	59.6	45.0	1458
5-GGGARTACCGGTCCATC-3' R	18	1	61.6	55.6	
5-TGCAGTCATCCGAYGACGA-3' F	20	1	72.8	55	1076
5-CCCATGTTGCCAAGGCTYTTGA-3' R	22	1	71.8	50	
5-TCAAGATGAACRCCACYGT-3' F	19	2	58.2	42.1	1755
5-TTCCAGAGCACCATCATCT-3' R	19	0	60.9	47.4	
5-AGATGATGGTGCTCTGGAA-3' F	19	0	60.9	47.4	1091
5-GARCCRGTGATYTTGTCAGC-3' R	20	3	55.8	45	
5-AACAAYACCRTC SYCATCGAGGC-3' F	23	4	69.7	43.5	1590
5-TGAGCGAGGCATGCGNAGNAGAAC-3' R	24	2	66.5	54.2	

Pb.- PARES DE BASES

ND*. - NUMERO DE DEGENERACIONES

PE.- PRODUCTO ESPERADO

*CORRESPONDE AL NUMERO DE BASES QUE NO ESTA CONSERVADA DENTRO DE LAS SECUENCIAS ALINEADAS

Anexo III. Protocolos de laboratorio

A. Extracción de ARN total de gónada y hepatopáncreas de centolla.

- 1.-Colocar ~100mg de tejido en un mortero previamente esterilizado y enfriado con nitrógeno líquido, congelar la muestra adicionándole nitrógeno líquido y homogenizarla con el pistilo del mortero.
- 2.-Transferir la muestra homogenizada a un tubo eppendorf de 1.5mL e inmediatamente adicionarle 1mL de trizol, homogenizar con vortex y colocar inmediatamente en hielo incubándolo por 5 min.
- 3.-centrifugar a 14000 rpm por 10 min a 4 °C.
- 4.-Transferir la fase acuosa a un tubo eppendorf nuevo de 1.5mL y adicionar 200µL de cloroformo, Homogenizar invirtiendo los tubos suavemente e incubar en hielo por 5 min.
- 5.-Centrifugar a 12000 rpm durante 15 min a 4 °C.
- 6.-Transferir la parte acuosa superior a un tubo eppendorf nuevo de 1.5mL, cuidando no tocar la capa intermedia.
- 7.-Adicionar 500µL de isopropanol, agitar para homogenizar e incubar durante 20 min a -20 °C.
- 8.-Centrifugar a 10000 rpm durante 10 min a 4 °C.
- 9.-Decantar el sobrenadante y lavar el pellet con 1mL de etanol al 75 % en DEPC.
- 10.-Centrifugar a 7000 rpm durante 5 min a 4 °C.
- 11.-Decantar el sobrenadante y dejar secar el pellet a temperatura ambiente.
- 12.-Resuspender el pellet en 30µL de agua libre de nucleasas.
- 13.-Almacenar a -80 °C hasta su uso.

B. Tratamiento con DNAsa

1.-En un microtubo de 0.2mL colocar 8 μ L de ARN total y agregar lo siguiente:

- 1 μ L de 10x DNase I reacción buffer.
- 1 μ L de DNase I Amp. Grade 1u/ μ L

2.-Incubar a 25 °C por 15 min.

3.-Adicionar 1 μ L de Stop Solution (EDTA 25 mM).

4.-Incubar a 65°C por 10 min.

5.-Colocar en hielo hasta la siguiente reacción o almacenar a -80°C.

C. Síntesis de ADNc

1.-Si las muestras de ARN tratadas con DNAsa se encuentran congeladas, descongelar gradualmente (pasar de -80 a -20 °C y después a hielo).

2.-Cuantificar la concentración de ARN en NANODROP.

3.-Mezclar el ARN con oligo (dT) en las siguientes proporciones:

ARN total (Hasta 1 μ g)	X μ L
Oligo dT (0.5 μ g)	1 μ L
H ₂ O libre de nucleasas	X μ L
<hr/>	
<i>Volumen final</i>	5 μ L

4.-Incubar a 70 °C por 5 minutos. Colocar y mantener en hielo

5.-Preparar la siguiente mezcla:

Im Prom II 5x buffer	4.0 μ L
MgCl ₂ (25 mM)	2.4 μ L
dNTP's (10 mM)	1.0 μ L
RNAasin	1.0 μ L
Improm II Transcriptasa Reversa	1.0 μ L
H ₂ O libre de nucleasas	5.6 μ L
<i>Volumen final</i>	15.0 μ L

5.-Adicionar a la mezcla de ARN + Oligo (dT) (5 μ L) 15 μ L de la mezcla anterior para obtener un volumen final de 20 μ L.

6.-incubar las muestras en un termociclador programado con las siguientes condiciones:

25 °C → 10 min (Alineación)

42 °C → 60 min (Extensión)

70 °C → 15 min (Inactivación de enzimas)

4 °C → 10 min

7.-Almacenar el ADNc a 20 °C hasta su uso.

D. LIGACIÓN

1.-Preparar la siguiente reacción.

Buffer 2x ligation	10 μ L
pGEM-T Vector	1 μ L
Fragmento purificado	8 μ L
DNA ligasa (T4)	1 μ L
<i>Volumen final</i>	20 μ L

2.-Incubar por 2h a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C

3.-Almacenar a -20 °C

E. TRANSFORMACION DE BACTERIAS COMPETENTES

- 1.-Preparar 1 día antes cajas Petri con medio LB-Agar con ampicilina y almacenarlas a 4° C.
- 2.-Poner las cajas a 37 °C al iniciar la transformación.
- 3.-Descongelar las bacterias en hielo
- 4.- Mezclar 2µL de ligación en 1 vial de células competentes.
- 5.-Incubar en hielo por 30 min.
- 6.-Dar choque térmico a 42 °C por 20s.
- 7.-Poner en hielo por 2 min.
- 8.-Adicionar en 250µL de medio SOC a temperatura ambiente.
- 9.-Incubar con rotación a 37 °C por 2h, colocando los tubos de manera horizontal.
- 10.-Inocular cajas Petri con LB-ampicilina con 30µL de cada transformación.
- 14.-Incubar toda la noche a 37 °C.

F. LEVANTAMIENTO DE COLONIAS

- 1.-Preparar un día antes cajas Petri con medio LB-Agar con ampicilina y almacenarlas a 4 °C.
- 2.-Poner las cajas a 37 °C, 30 minutos antes de iniciar el levantamiento de colonias.
- 3.-Levantar las colonias más aisladas con un palillo de madera, pasar a una caja Petri con LB-Ampicilina nueva.
- 4.-Marcar las colonias levantadas en la caja Petri.
- 5.-Incubar a 37 °C toda la noche.

G. PCR colony

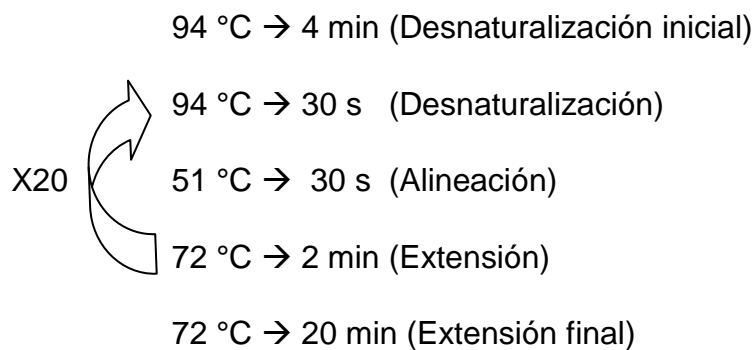
1.-Colocar el palillo con el que se levantó la colonia transformada en un microtubo de 200 μ L con 20 μ L de H₂O para PCR y enjuagar muy bien el palillo hasta que el agua se ponga turbia.

2.-Incubar el tubo por 10 min a 85 °C

3.-Preparar la siguiente reacción:

5X Colorless GoTaq Flexi Buffer	2.0 μ L
MgCl ₂ (25 mM)	1.0 μ L
dNTP's (10 mM)	0.2 μ L
M13 (Forward) (500 nm de concentración final)	X μ L
M13 (Reverse)(500 nm de concentración final)	X μ L
GoTaq Flexi DNA Polimerasa	0.2 μ L
Templado (Agua donde se lavó el palillo)	X μ L
<i>Volumen final</i>	<u>10 μL</u>

4.-Correr las muestras en un PCR con el siguiente programa:



5.-Correr las muestras en una electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE 1X por 40 min a 100 v

6.-Visualizar los productos en un fotodocumentador.