



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

**EFFECTO DE ORGANISMOS PRODUCTORES DE  
TOXINAS PSP Y DSP EN LA EXPRESIÓN DE GENES DE  
RESPUESTA INMUNE EN JUVENILES DE *Crassostrea  
gigas* (Thunberg, 1793).**

**TESIS**

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales

(Orientación Biotecnología)

P r e s e n t a

**Ana Karina Kao Godinez**

La Paz, Baja California Sur, Marzo del 2015

## ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12:00 horas del día 24 del mes de Febrero del 2015, se procedio por los abajo firmantes miembros de la Comision Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biologicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"EFECTO DE ORGANISMOS PRODUCTORES DE TOXINAS PSP Y DSP EN LA EXPRESIÓN DE GENES DE RESPUESTA INMUNE EN JUVENILES DE *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793)"**

Presentada por el alumno:

**ANA KARINA KAO GODINEZ**

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN BIOTECNOLOGIA

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

LA COMISION REVISORA



\_\_\_\_\_  
DRA. NORMA Y. HERNANDEZ SAAVEDRA  
DIRECTOR DE TESIS



\_\_\_\_\_  
DRA. REYNA DE JESUS ROMERO GERALDO  
CO-TUTOR



\_\_\_\_\_  
DR. ALFONSO MAEDA MARTINEZ  
CO- TUTOR



\_\_\_\_\_  
DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA

DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO Y FORMACION DE RECURSOS HUMANOS

## CONFORMACIÓN DE COMITÉS

### Director de tesis:

Dra. Norma Y. Hernández Saavedra                      Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

### Comité tutorial:

Dr. Alfonso N. Maeda Martínez                      Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dra. Norma Y. Hernández Saavedra                      Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dra. Reyna de Jesús Romero Geraldo                      Instituto Tecnológico de La Paz

### Comité revisor de tesis:

Dr. Alfonso N. Maeda Martínez                      Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dra. Norma Y. Hernández Saavedra                      Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dra. Reyna de Jesús Romero Geraldo                      Instituto Tecnológico de La Paz

### Junta de examen de grado:

Dr. Alfonso N. Maeda Martínez                      Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dra. Norma Y. Hernández Saavedra                      Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dra. Reyna de Jesús Romero Geraldo                      Instituto Tecnológico de La Paz

### Suplente:

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes                      Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

## RESUMEN

*Crassostrea gigas*, es la especie de ostión más cultivada en el mundo, constituye un modelo biológico de gran importancia económica. Desde 1993 se han registrado mortalidades recurrentes en las principales zonas del cultivo y aunque se han identificado episodios de Florecimientos Algales Nocivos (FAN) previos a estos episodios de mortalidad, no se ha podido establecer aun una clara correlación.

En el litoral Mexicano, el impacto de los FAN de dinoflagelados tóxicos sobre diversas especies marinas, entre ellas los moluscos bivalvos, es un fenómeno que se ha observado con mayor frecuencia. En el presente trabajo se expusieron a juveniles de 3-5 mm de *C. gigas* a una combinación de los dinoflagelados *Prorocentrum lima* y *Gymnodinium catenatum* productores de toxinas DSP y PSP respectivamente, obteniendo el perfil de expresión de distintos genes relacionados con la respuesta inmune y el sistema defensa (*lgbp*, *t1p*, *inm*, *if44*, *cp1* y *cvt*). En el bioensayo se consideraron como variables el tiempo de exposición ( 1, 3, 5 y 7 días) y la combinación de tres concentraciones celulares de dinoflagelados tóxicos, TR1 (*G.catenatum*  $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> y *P.lima*  $3 \times 10^2$  cel mL<sup>-1</sup>), TR2 (*G.catenatum*  $1.5 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> y *P.lima*  $1.5 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) y TR3 (*G.catenatum*  $3 \times 10^2$  cel mL<sup>-1</sup> y *P.lima*  $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>), empleando *Isochrysis galbana* ( $7.5 \times 10^5$  cel mL<sup>-1</sup>) como alimento para el grupo control CI. El estudio de la expresión se llevó a cabo mediante la técnica de qPCR. Se realizó la validación de los genes de referencia, para estas condiciones experimentales, siendo TUB, ACT y GAPDH los más estables con base en los algoritmos utilizados (GeNorm, NormFinder). La exposición de los ostiones a *G. catenatum* y *P. lima* provocó un aumento en el nivel de transcripción de genes que codifican proteínas implicadas en la respuesta inmune, principalmente en los tratamientos donde *P. lima* se encontraba mayormente disponible. Por lo cual, los cambios a nivel transcripcional de los genes monitoreados fueron tiempo-tratamiento dependientes. En general, estos cambios sugieren una relación directa con la ingestión de los diferentes concentraciones de dinoflagelados tóxicos en cada tratamiento. El incremento en la expresión de *cp1* podría indicar un proceso inflamatorio severo desencadenando daño tisular en el ostión a partir del 5to día de exposición, así mismo el gen *inm* podría desempeñar un papel importante en la activación de proteínas a mediano y largo plazo, y probablemente tenga una función de opsonina facilitando la fagocitosis de cuerpos reconocidos como extraños. Se pudo corroborar la función del producto del gen *t1p* como receptor en el sistema de reconocimiento de patrones moleculares para la detección de patógenos, e iniciación de la respuesta inflamatoria. En los diferentes tratamientos, la modulación de los genes *cvt*, *lgbp* e *if44* indica el reconocimiento de agentes extraños por el sistema inmune de *C. gigas*, lo que indica que estos genes podrían desempeñar funciones en la citoprotección e inmunidad, principalmente durante las primeras 24 h de exposición, confirmando su actuación como primera línea de defensa en el ostión. Los resultados sugieren que, aunque a las dosis ensayadas no son letales, los dinoflagelados tóxicos *P. lima* y *G. catenatum* pueden afectar de manera significativa la capacidad de respuesta del sistema inmune a través de la modificación de los niveles de transcripción de los genes antes mencionados Esta combinación de efectos, puede promover una mayor susceptibilidad de *C. gigas* a las infecciones, sobre todo cuando se producen las FAN en combinación con otros factores de estrés, como por ejemplo durante episodios de "mortalidad de verano". Así las FAN podrían potenciar el riesgo de factores de estrés adicionales en ambientes naturales y/o acuícolas y, como consecuencia, afectar significativamente la supervivencia del ostión.

**Palabras clave:** *C. gigas*, FAN, *P. lima*, *G. catenatum*, PSP, DSP, expresión génica, respuesta inmune y qPCR.

## ABSTRACT

*Crassostrea gigas* is one of the most cultured marine species in the world because it is a biological model of great economic importance. Since 1993, recurring mortalities have taken place in the main farming areas of cultivation. Although episodes of harmful algal blooms (HABs) before mortality events have been identified, a clear correlation has not been established yet. In the Mexican coast, the impact of HABs from toxic dinoflagellates on various marine species, including bivalve mollusks, is a phenomenon frequently observed. In this work, we exposed 3-5 mm *C. gigas* juveniles to the dinoflagellates *Prorocentrum lima* and *Gymnodinium catenatum*, DSP and PSP toxin producers, respectively, obtaining a gene expression profile in different gene groups related to immune response and defense system (*lgbp*, *tlp*, *imm*, *if44*, *cp1*, and *cvt*). In the bioassay, exposure time (1, 3, 5, and 7 d) and the combination of three cell concentrations of toxic dinoflagellates were considered as variables: TR1 (*G. catenatum*  $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> and *P. lima*  $3 \times 10^2$  cel mL<sup>-1</sup>); TR2 (*G. catenatum*  $1.5 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> and *P. lima*  $1.5 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>); and TR3 (*G. catenatum*  $3 \times 10^2$  cel mL<sup>-1</sup> and *P. lima*  $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) using *Isochrysis galbana* ( $7.5 \times 10^5$  cel mL<sup>-1</sup>) as feed for the control group C1. The study of the expression was performed by qPCR. Validation of reference genes was performed with TUB, ACT and GAPDH more stable based on the algorithms used (GeNorm, NormFinder) for these experimental conditions. The exposure of the oysters to *G. catenatum* and *P. lima* caused an increase in the transcription level of the genes encoding proteins involved in immune response, mainly in the treatments where *P. lima* was mostly available. Therefore, changes at the transcriptional level of the genes monitored were time-treatment dependent. In general, these changes lead to a relationship with ingestion of the different concentrations of toxic dinoflagellates in each treatment. The increased *cp1* expression might indicate a severe inflammatory process triggering tissue damage in oysters from the 5th day of exposure. Furthermore, the *imm* gene may play an important role in protein activation in the medium and long term, and probably it has an opsonin function, facilitating phagocytosis recognized as foreign bodies. To conclude the *tlp* gene functions as receptor in the molecular recognition system standards for the detection of pathogens and initiation of the inflammatory response. In different treatments, modulation of *cvt*, *lgbp* and *if44* genes indicates recognition of foreign agents by the immune system of *C. gigas*, indicating that these genes may play roles in cytoprotection and immunity, mainly during the first 24 h of exposure, confirming action as a first line of defense in the oyster. The results suggest that although the doses tested are not lethal, toxic dinoflagellates *P. lima* and *G. catenatum* can significantly affect the responsiveness of the immune system by modifying transcription levels of the genes previously mentioned. This combination of effects, can promote greater susceptibility of *C. gigas* to infections, especially when HABs occur in combination with other stressors, such as during episodes of "summer mortality". Therefore, HABs could potentiate the risk of additional stressors in natural and/or aquaculture environments and thus significantly affect the oyster's survival of oysters.

**Key words:** *Crassostrea gigas*, HABs, *P. lima*, *G. catenatum*, PSP, DSP, immune response, gene expression, qPCR.

## DEDICATORIA

### **A mi familia.**

A mis abuelos, sin ellos no estaría aquí.

A mi mejor amigo y amor de mi vida, mi esposo.

A mi hijo (aunque todavía estas en mi vientre, te amo con todo mi ser).

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo hubiese sido imposible sin la participación de personas e instituciones que han facilitado las cosas para que éste llegara a término.

Gracias a SEP-CONACYT por el apoyo al proyecto CB 083442 y a la beca otorgada 278236 por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) para la realización de este proyecto.

Gracias al CIBNOR (proyecto fiscal CIBNOR EP 3.06) y al Laboratorio de Genética Molecular, por todas las facilidades otorgadas para el uso de sus instalaciones para la realización de esta tesis de maestría; a todos los responsables del programa de posgrado por todas las atenciones y disponibilidad.

Gracias a mi comité tutorial: Dra. Norma Y. Hernández Saavedra, Dra. Reyna de Jesús Romero Geraldo y al Dr. Alfonso N. Maeda Martínez por su apoyo para la realización de este trabajo.

Especialmente gracias a la Dra. Norma Y. Hernández Saavedra, por haberme aceptado para formar parte del proyecto de investigación. Por todo el tiempo invertido, entusiasmo y participación activa en el desarrollo de este trabajo, muchas gracias por compartir su espacio y permitirme vivir una experiencia tan importante para mi formación profesional.

Gracias a la Dra. Reyna de Jesús Romero Geraldo por sus siempre atentas y rápidas respuestas a las diferentes inquietudes surgidas durante el desarrollo de este trabajo. Por la asesoría constante y ayuda en todo lo que requería. Muchas gracias.

Muchas gracias a la Dra. Norma Lagunas (que aunque no formo parte de mi

comité tutorial oficialmente, la considero parte de el) por su asesoría constante y sobre todo por su disponibilidad y paciencia, de la misma forma a Arturo P. Sierra Beltrán por siempre estar dispuesto a escuchar y ayudar cuando lo necesite, especialmente gracias por ser un ejemplo de dedicación y amor a su trabajo.

Agradezco especialmente a la M.C Delia Irene Rojas Posadas, por su amabilidad y disponibilidad, para realizar todas las actividades de laboratorio. Pero sobre todo por su amistad.

Gracias a los técnicos, Marte Virgen Félix y Julián Alfonso Garzón Favela, por su apoyo durante este proceso.

A la Maestra Diana Dorantes por su constante empeño en que le dedicara tiempo y esfuerzo para cumplir con el requisito del inglés, y por su apoyo en la edición del resumen en idioma inglés de esta tesis.

A mi esposo Miguel, gracias por apoyarme y acompañarme en todos los momentos de esta etapa, dándome el ánimo y fuerza, agradezco a Dios el haberte puesto en mi camino.

A mis compañeros y amigos de maestría: Caro, Héctor, Marcelo y Raziel por compartir esta experiencia, por los ánimos mutuos y por la amistad que se formó entre nosotros; a mis compañeros de laboratorio Paloma y Angie por los buenos momentos y al resto de los compañeros y amigos por todas las risas y los días de diversión que pasamos juntos.

A Horacio Sandoval, por su apoyo y disposición en todo momento en el laboratorio de cómputo y para el funcionamiento de los medios audiovisuales.

A todas las personas que directa o indirectamente contribuyeron en la



elaboración de esta tesis y que en este momento no los tengo presentes, gracias.

Sobre todo agradezco a mi familia. A mis padres, tíos, hermanos, primos y abuelos. Sin su apoyo e inspiración habría sido imposible culminar a esta etapa de mi vida.

## CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1. Ostión del Pacífico ( <i>C. gigas</i> ) .....	2
1.2. Aspectos inmunológicos.....	4
1.3. Florecimientos algales nocivos (FAN).....	5
1.4. Clasificación de las toxinas .....	6
1.4.1. Toxinas PSP.....	7
1.4.1.1. Mecanismo de acción.....	9
1.4.2. Toxinas DSP .....	10
1.4.2.1. Mecanismo de acción.....	11
<b>2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>13</b>
2.1. Genes blancos para estudiar la respuesta molecular de la exposición de <i>C. gigas</i> a dinoflagelados tóxicos. ....	16
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>18</b>
<b>4. HIPÓTESIS .....</b>	<b>19</b>
<b>5. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>20</b>
5.1. Objetivos Específicos .....	20
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
a. Cultivo de microalgas .....	21
i. <i>Gymnodinium catenatum</i> .....	21
ii. <i>Prorocentrum lima</i> .....	21
iii. <i>Isochrysis galbana</i> .....	21
b. <i>Crassostrea gigas</i> .....	22
c. Diseño experimental .....	22
i. Bioensayo en juveniles (3-5 mm) de <i>C. gigas</i> .....	22
d. Oligonúcleotidos para qPCR .....	24
e. Extracción de ARN total y síntesis de ADN complementario .....	25
f. PCR en tiempo real (qPCR) .....	26
i. Estandarización de la eficiencia para qPCR .....	26
ii. Análisis de estabilidad de los candidatos a genes de referencia.....	27
iii. Análisis cuantitativo de expresión génica .....	29
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
7.1. Bioensayo en juveniles de <i>C. gigas</i> (3-5mm).....	31
7.1.1. Extracción de ARN total y síntesis de ADN complementario.....	31
7.2. PCR en tiempo real (qPCR) .....	31
7.2.1. Análisis de estabilidad de los candidatos a genes de referencia .....	31
7.2.2. Análisis cuantitativo de expresión génica.....	33
7.2.2.1. Análisis de la expresión para el efecto combinado PSP > DSP (TR1) de organismos productores de toxinas marinas en la tasa de transcripción de genes de respuesta inmune.....	33

7.2.2.2. Análisis de la expresión para el efecto combinado PSP = DSP (TR2) de organismos productores de toxinas marinas en la tasa de transcripción de genes de respuesta inmune.....	35
7.2.2.3. Análisis de la expresión para el efecto combinado PSP < DSP (TR3) de organismos productores de toxinas marinas en la tasa de transcripción de genes de respuesta inmune.....	36
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>40</b>
8.1. Análisis cuantitativo de expresión génica .....	42
8.1.1. Análisis de la expresión génica en relación a los diferentes tratamientos .	42
8.1.2. Expresión génica en cada gen .....	43
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>46</b>
<b>10. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>48</b>
<b>11. ANEXOS .....</b>	<b>59</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Anatomía de una ostra (modificado de Galtsoff, 1964).....	<b>4</b>
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática del sistema de exposición (tomado de López, 2012).....	<b>23</b>
<b>Figura 3.</b> Promedio de la estabilidad de la expresión de genes candidatos de referencia en juveniles de <i>C. gigas</i> , calculados con los softwares GeNorm y NormFinder.....	<b>32</b>
<b>Figura 4.</b> Expresión relativa de <b>a)</b> cavortina ( <i>cvt</i> ), proteína de unión a LPS y $\beta$ -1,3 glucano ( <i>lgbp</i> ) y proteína inducida por interferón 44 ( <i>if44</i> ); y <b>b)</b> inmonoglobulina ( <i>inm</i> ), caspasa 1 ( <i>cp1</i> ) y proteína de interacción-Toll ( <i>tlp</i> ) en <i>C. gigas</i> expuestos al Tratamiento 1, <i>G.catenatum</i> $3 \times 10^3$ <i>P.lima</i> $3 \times 10^2$ .....	<b>34</b>
<b>Figura 5.</b> Expresión relativa de <b>a)</b> cavortina ( <i>cvt</i> ), proteína de unión a LPS y $\beta$ -1,3 glucano ( <i>lgbp</i> ) y proteína inducida por interferón 44 ( <i>if44</i> ); y <b>b)</b> inmonoglobulina ( <i>inm</i> ), caspasa 1 ( <i>cp1</i> ) y proteína de interacción-Toll ( <i>tlp</i> ) en <i>C. gigas</i> expuestos al Tratamiento 2, <i>G.catenatum</i> $1.5 \times 10^3$ <i>P.lima</i> $1.5 \times 10^3$ .....	<b>35</b>
<b>Figura 6.</b> Expresión relativa de <b>a)</b> cavortina ( <i>cvt</i> ), proteína de unión a LPS y $\beta$ -1,3 glucano ( <i>lgbp</i> ) y proteína inducida por interferón 44 ( <i>if44</i> ); y <b>b)</b> inmonoglobulina ( <i>inm</i> ), caspasa 1 ( <i>cp1</i> ) y proteína de interacción-Toll ( <i>tlp</i> ) en <i>C. gigas</i> expuestos al Tratamiento 3, <i>G.catenatum</i> $3 \times 10^2$ <i>P.lima</i> $3 \times 10^3$ .....	<b>36</b>
<b>Figura 7.</b> Expresión relativa de <b>a)</b> cavortina ( <i>cvt</i> ), <b>b)</b> proteína inducida por interferón 44 ( <i>if44</i> ) <b>c)</b> proteína de interacción-Toll ( <i>tlp</i> ), <b>d)</b> inmonoglobulina ( <i>inm</i> ), <b>e)</b> caspasa 1 ( <i>cp1</i> ) y <b>f)</b> proteína de unión a LPS y $\beta$ -1,3 glucano ( <i>lgbp</i> ) en <i>C. gigas</i> expuestos al los tratamientos TR1, TR2 y TR3.....	<b>39</b>

**LISTA DE TABLAS**

<b>Tabla I.</b> Genes blanco y su función bioquímica.....	<b>16</b>
<b>Tabla II.</b> Tratamientos.....	<b>22</b>
<b>Tabla III.</b> Bioensayo de exposición sucesiva a dinoflagelados tóxicos.....	<b>24</b>
<b>Tabla IV.</b> Relación de genes para el análisis de qPCR.....	<b>25</b>
<b>Tabla V.</b> Relación de candidatos a genes de referencia y características.....	<b>28</b>
<b>Tabla VI.</b> Clasificación de los genes de referencia candidatos por Genorm, NormFinder y BestKeeper.....	<b>33</b>
<b>Tabla VII.</b> Desviación estándar por tratamiento de los genes blanco.....	<b>59</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

En México la acuicultura de bivalvos se realiza casi exclusivamente en las costas del Pacífico de Baja California y en el Golfo de California, y ocupa el cuarto lugar en producción en América Latina después de Chile, Brasil y Perú. Los datos de producción de FAO inician en 1987 con 20 ton, posteriormente la producción se incrementa a 2,200 toneladas en 1990. En 1993 la producción declina a 1,053 ton y en 1995 se incrementa a 2,500 ton y a 3,038 ton en 1997. Después de ese año la producción decreció a un promedio de 1,500 ton anuales, cifra que se ha mantenido hasta el 2005. Las causas de estas variaciones en el cultivo de ostras se deben principalmente a problemas en la obtención de juveniles y a las mortandades masivas (Maeda-Martínez, 2008).

En México, la producción se basa prácticamente en la ostra del Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) y en menor grado en el ostión de placer (*Crassostrea corteziensis*), el mejillón (*Mytilus galloprovincialis*), la almeja catarina (*Argopecten ventricosus*) y en la ostra perlera *Pteria sterna* (Maeda-Martínez, 2008).

*C. gigas*, también llamado ostión japonés, es la especie de ostión más cultivada en el mundo, debido a su potencial de rápido crecimiento y su gran tolerancia a las condiciones ambientales, constituye por tanto un modelo de gran importancia económica. En el 2003 el valor de la producción total de esta especie fue de 3,690 millones de dólares. Sin embargo, como en otros países, en Australia se han registrado mortalidades recurrentes desde 1993, y más recientemente en México entre 1997 y 2001 (Barbosa, 2004; FAO, 2008-2013). En la costa noreste de E.U.A., se tienen registros de severas mortandades en ostiones juveniles de *Crassostrea virginica*, además de otras especies como *C. gigas*. Derivado de ello, se han establecido varias hipótesis para tratar de explicar las posibles causas primarias de la mortandad, como son: la presencia de un agente tóxico de origen bacteriano o microalgal, o alguna alteración físico-química (Malham *et al.*, 2009).

A través de varias investigaciones como lo son estudios histológicos, bacteriológicos, epidemiológicos (Pearce *et al.*, 2005) y moleculares (Barbosa, 2004), se ha determinado que el origen de los eventos de mortalidad no es infeccioso, así como tampoco se ha

podido establecer una correlación con la presencia de pesticidas o contaminantes naturales y/o artificiales en los cuerpos de agua. No obstante, se han identificado episodios de FANs previos a los episodios de mortalidad producidos por el dinoflagelado desnudo *Akashiwo sanguinea* (Bricelj *et al.*, 1992) el cual produce “mycosporine-like amino acids” (MAAs) que son tensoactivos solubles en agua y en Australia *Ostreopsis siamensis* (Pearce *et al.*, 2005) productor de una toxina análoga a Palitoxina.

### **1.1. Ostión del Pacífico (*C. gigas*)**

El ostión (Fig. 1) es un molusco que pertenece a la clase Bivalvia, también denominada Pelecipoda ó Lamelibranquia, de acuerdo con Rupert y Barnes (1995). La taxonomía de *C. gigas* es la siguiente:

**Reino:** Animalia.

**Phylum:** Mollusca (Linnaeus, 1758)

**Clase:** Bivalvia (Linnaeus, 1758)

**Subclase:** Pteriomorphia (Beurlen, 1944)

**Orden:** Ostreoida (Férussac, 1822)

**Superfamilia:** Ostreoidea (Rafinesque, 1815)

**Familia:** Ostreidae (Rafinesque, 1815)

**Género:** *Crassostrea* (Sacco, 1897)

**Especie:** *gigas* (Thunberg, 1793).

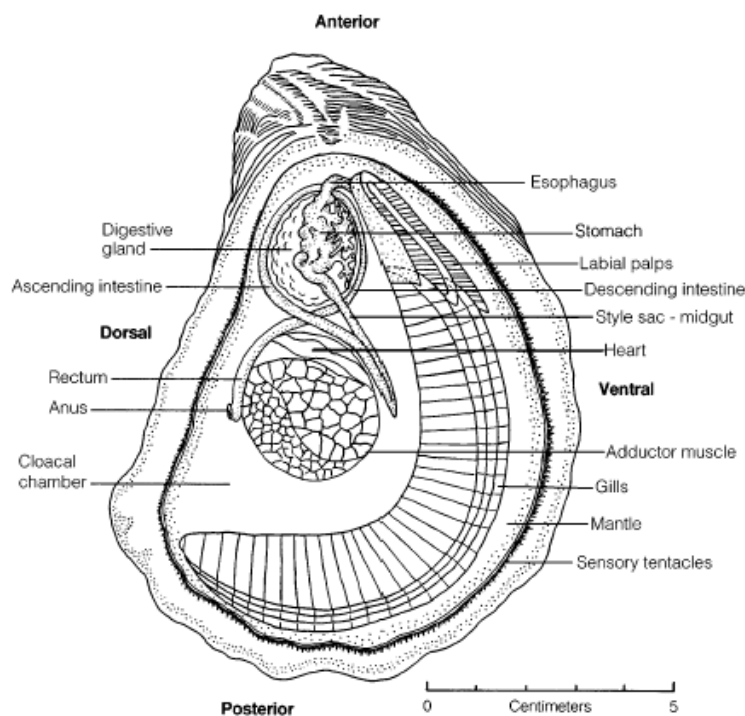
La clase Bivalvia está conformada principalmente por almejas, ostras y mejillones. Sus características específicas son: comprimidos lateralmente; concha normalmente de dos valvas dorsalmente articuladas entre sí por ligamentos elásticos y dientes de concha; conchas cerradas por los músculos aductores, la cabeza rudimentaria, sin ojos ni rádula, aunque los ojos y estatocistos puede ocurrir en otras partes del cuerpo; pie típicamente comprimido lateralmente, por lo general sin una suela; un par grande de ctenidios bipectinados, utilizados en combinación con los palpos labiales en la alimentación

ciliar; cavidad del manto grande; bordes posteriores del manto a menudo fusionados para formar sifones, inhalante y exhalante; un par de nefridios (Rupert y Barnes ,1995). El cuerpo se encuentra envuelto por el manto que está involucrado en la síntesis de la concha y en las funciones sensoriales, pues el organismo es capaz de presentar retracción ante estímulos nerviosos (Ruppert y Barnes, 1995). El estómago es utilizado en la digestión del alimento y continúa en un intestino y un recto hasta el ano. La glándula digestiva es un órgano que rodea al estómago. Las branquias lamelares que se extienden en la región ventral (desde la boca hasta el ano) tienen una función respiratoria, excretora y nutricia. El músculo abductor es empleado para la apertura y cierre de las valvas. Las branquias también presentan tejido muscular, lo que permite mantener la circulación de la hemolinfa (carente de pigmentos transportadores de oxígeno). La hemolinfa es impulsada por el corazón, ubicado en la cavidad pericardiaca, adyacente al músculo abductor. El corazón impulsa la hemolinfa a través de arterias que humedecen los órganos, y la hemolinfa es colectada posteriormente en senos venenosos para su paso a través de las branquias (FAO, 2006).

Para obtener su alimento, *C. gigas* pasa el agua a través de sus branquias, reteniendo la materia orgánica en su sistema digestivo, por lo que en sistemas costeros tiene un importante rol trófico como organismo filtrador (Cognie *et al.*, 2006). Así mismo, filtra el alimento del agua y lo dirige hacia los palpos labiales donde es clasificado antes de pasar a la boca; los bivalvos tienen la capacidad de seleccionar alimentos filtrados del agua. Esta capacidad de selección pre-ingestiva de partículas está asociada a la detección de metabolitos secundarios (Espinosa *et al.*, 2007). Una vez que el bolo alimenticio es amalgamado por el moco, pasa a la boca y a veces es rechazado por los palpos labiales y eliminado en forma pseudoheces (Helm *et al.*, 2006).

Sin embargo, debido a su característica de filtrador el ostión retiene todo tipo de partículas sólidas, muchas de las cuales son flóculos sedimentarios que pueden transportar cualquier cantidad de sustancias tóxicas, como las toxinas marinas que están presentes en diversas especies de microalgas tóxicas (Bricelj y Shumway, 1998).





**Figura 1.** Anatomía de una ostra. Modificado de Galtsoff (1964).

### **1.2. Aspectos inmunológicos**

Los moluscos, como todos los invertebrados, disponen de un sistema de defensa que los protege contra patógenos. A diferencia de los vertebrados, el sistema inmune de los moluscos parece estar restringido a una inmunidad innata o natural, y está representado principalmente por hemocitos, proteínas plasmáticas y reacciones integradas en sistemas multiméricos que involucran componentes celulares y humorales (Fisher, 1988; Sindermann, 1990; Vargas-Albores y Barraco, 2001). Debido a que los moluscos bivalvos tienen un sistema circulatorio abierto compuesto por senos, la hemolinfa baña todos los tejidos permitiendo que los hemocitos y los componentes humorales se distribuyan uniformemente, favoreciendo el encuentro con las partículas (bióticas y abióticas) y llegar a los sitios donde son requeridas (Allam y Pillard, 1998; Vargas-Albores y Barraco, 2001). La respuesta antimicrobial en *C. gigas*, la cual se piensa controla patógenos y comensales, decae en potentes reacciones oxígeno-dependientes y en péptidos/proteínas antimicrobianas (AMPs, por sus siglas en inglés) producidos a bajas concentraciones por células epiteliales y/o por los hemocitos circulantes. En ostiones sanos, los hemocitos expresan niveles basales de defensinas

(Cg-Defs) y péptidos ricos en prolina (Cg-Prps). Cuando la carga bacteriana aumenta dramáticamente en los tejidos del ostión, ambas familias de AMP son conducidas a sitios de infección por los hemocitos, junto proteínas de permeabilidad bactericida (Cg-BPI, por sus siglas en inglés) y otras formas de defensinas de alto peso molecular (Cg-BigDef, por sus siglas en inglés), cuya expresión en hemocitos es inducida por la infección. Esta co-localización de AMPs en los sitios de infección puede ser determinante en limitar la invasión. Para sobrellevar la respuesta antimicrobiana del ostión, estos patógenos han desarrollado sutiles mecanismos de resistencia y evasión (Schmitt *et al.*, 2012).

De acuerdo con Dyrynda *et al.* (1995) la mayoría de los estudios sobre el sistema inmune de los moluscos bivalvos se han realizado en adultos, a pesar de la importancia que podría tener el conocimiento de la ontogenia de su sistema inmune, sin embargo, recientemente se han realizado los primeros esfuerzos en esta dirección (Luna-González, 2003). Actualmente, se sabe muy poco acerca de las reacciones inmunes en estadios tempranos del ciclo de vida de los moluscos, debido a las dificultades al trabajar con larvas o estadios tempranos de desarrollo, los cuales no pueden ser sangrados de la misma manera que los adultos.

### **1.3. Florecimientos algales nocivos (FAN)**

Las algas planctónicas microscópicas de los océanos del mundo resultan críticas para los mariscos bivalvos que se alimentan por filtración, así como para las larvas de crustáceos y peces con escamas comercialmente importantes (FAO, 2005).

Las proliferaciones de algas en aguas marinas o salobres pueden causar la muerte masiva de peces y la contaminación de mariscos con toxinas, además de alterar los ecosistemas. La comunidad científica se refiere a estos eventos con el nombre genérico de Floraciones Algales Nocivas, FAN (o HABs, por sus siglas en inglés, Harmful Algal Blooms), sin dejar de reconocer que algunas especies causan efectos tóxicos aun a bajas densidades celulares y que no todas las especies de FAN son técnicamente “algas”. En una clasificación amplia de las especies de FAN se distinguen dos grupos: 1) las productoras de toxinas, que pueden contaminar mariscos o matar peces; y 2) las que

producen altas cantidades de biomasa, las cuales pueden causar anoxia y una muerte indiscriminada de la vida marina después de alcanzar grandes concentraciones (GEOHAB, 2001). Ambos tipos de floraciones pueden causar efectos devastadores en los cultivos de moluscos y peces, tanto desde el punto de vista económico como por el daño fisiológico que le pueden ocasionar a los organismos (GEOHAB, 2003).

Existen alrededor de 75 especies de microalgas capaces de producir poderosas toxinas (denominadas ficotoxinas) que se transfieren a través de la cadena alimentaria (moluscos, crustáceos y peces de escama) para ser consumidos finalmente por seres humanos, provocando diversas enfermedades gastrointestinales y neurológicas. Algunas especies de algas producen bajas concentraciones de toxinas de unos pocos cientos de células por litro, en tanto que otras deben contar con millones de células por litro, para resultar de alguna manera perjudiciales. La mayoría de las especies tóxicas tiene patrones de distribución limitados, aunque algunas se pueden encontrar por todo el mundo. Las toxinas que producen las microalgas son metabolitos secundarios a los que no se les ha asignado un papel explícito en la economía interna de los organismos, probablemente son utilizadas por los organismos que las producen como estrategia de invasión o preservación de espacio, para combatir la predación o como defensa contra el crecimiento desmesurado de otros organismos (FAO, 2005).

En el litoral Mexicano, el impacto de los florecimientos de dinoflagelados tóxicos sobre diversas especies marinas, y entre ellas los moluscos bivalvos, es un fenómeno que se ha observado con mayor frecuencia (Herrera-Sepúlveda *et al.*, 2008). Se han identificado tres géneros frecuentes, como productores de FANs, tóxicas para los humanos: *Pyrodinium* (*P. bahamense var. compressum*), productor de toxinas PSP; *Gymnodinium* (*G. catenatum* y *G. brevis* -*Karenia brevis*-), productor de toxinas PSP y *Prorocentrum*, productor de toxinas DSP (Ochoa, 2003).

#### **1.4. Clasificación de las toxinas**

Como se mencionó anteriormente existen especies de microalgas capaces de producir poderosas toxinas denominadas ficotoxinas. Las ficotoxinas marinas más importantes son las toxinas de mariscos y las ciguatoxinas. Hasta ahora, se distinguen cinco grupos de toxinas de mariscos, denominadas:

- I. Toxinas paráliticas de mariscos, causantes de la intoxicación parálitica por mariscos (PSP, por sus siglas en inglés Paralysis Shellfish Poisoning);
- II. Toxinas de mariscos diarreicas, causantes de intoxicación diarreica por mariscos (DSP, por sus siglas en inglés Diarrheic Shellfish Poisoning);
- III. Toxinas de mariscos amnésicas, causantes de intoxicación amnésica por mariscos (ASP, por sus siglas en inglés Amnesic Shellsish Poisoning);
- IV. Toxinas de mariscos neurotóxicas, causantes de intoxicación neurotóxica por mariscos (NSP, por sus siglas en inglés Neurotoxic Shellfish Poisoning); y
- V. Toxinas de mariscos azaspirácidas, causantes de intoxicación azaspirácida por mariscos (AZP, por sus siglas en inglés Azaspiracid Shellfish Poisoning) (Hallegraeff *et al.*, 1995; Lindahl, 1998).

Las ciguatera es un tipo de intoxicación causada por ciguatoxinas (CFP, por sus siglas en inglés Ciguatera Fish Poisoning) a través del consumo de peces marinos carnívoros tropicales y sub tropicales que han acumulado la toxina (de la ciguatera) a lo largo de la cadena alimenticia. Los síndromes PSP, DSP, ASP, NSP y AZP son causadas en los humanos por el consumo de productos de mariscos contaminados (FAO, 2005). Para efecto de estudio de la presente tesis se trabajó con dos especies de dinoflagelados tóxicos: *Gymnodinium catenatum* que se caracteriza por ser un productor de toxinas PSP y *Prorocentrum lima* el cual produce toxinas del tipo DSP.

#### 1.4.1. Toxinas PSP

Las toxinas paralizantes son las causantes de las intoxicaciones por consumo de mariscos más severas a nivel mundial. Es una familia muy compleja de tetrahidropurinas conocidas como saxitoxinas porque fueron descritas por primera vez al ser aisladas de moluscos del género *Saxidomus* (Schantz, 1986); fue la primera toxina de origen natural en ser caracterizada químicamente (Schantz *et al.*, 1975). Es un compuesto altamente soluble en agua, medianamente soluble en metanol y ácidos concentrados, insoluble en solventes orgánicos que se destruye rápidamente en medios de elevada alcalinidad (Hall *et al.*, 1990; Premazzi y Volterra, 1993). El grupo de las Saxitoxinas comprende al menos 21 derivados los cuales son agentes bloqueadores del

canal de sodio en mamíferos. Las toxinas PSP constituyen un grupo de compuestos de la tetrahidropurina estrechamente relacionados, que están divididas en 4 subgrupos: 1) carbamato (STX, neoSTX y GNTX1-4); 2) N-sulfo-carbamoil (GNTX5-6, C1-4); 3) decarbamoil (dcSXT, dcneoSXT, dcGNTX1-4) y 4) desoxicarbamoil (doSXT, doneoSXT y doGNTX1). Las toxinas carbamatos y las decarbamoilo son compuestos más tóxicos que los sulfocarbamoilos. Las toxinas carbamato, altamente tóxicas son: saxitoxina (STX), neosaxitoxina (NEO) y gonyautoxinas (GTX-1 a 4). Los análogos de toxicidad intermedia decarbamoilo: (dcSTX, dcNEO, dcGTX-1 a 4) y deoxidecarbamoilo: (doSTX, doGTX-2, doGTX-3). Los derivados con menor toxicidad son toxinas N-sulfocarbamoilo, B1 (GTX-5), B2 (GTX-6) y, C1-C4. Se conocen tres análogos p-hidroxibenzoato, producidos por *G. catenatum*, los cuales al ser hidrofóbicos no son reconocidos utilizando el método tradicional de extracción con ácido clorhídrico (Negri *et al.*, 2003).

Las toxinas PSP se encuentran en algunos géneros de dinoflagelados y en algunas especies de cianobacterias. Las especies del genero *Alexandrium* (sin. *Gonyaulax* o *Protogonyaulax*) identificadas como contaminantes en moluscos son: *A. tamarensis*, *A. minutum* (sin. *A. excavata*), *A. catenella*, *A. fraterculus*, *A. Fundyense*, *A. tamiyavanichi* y *A. cohorticula*, entre otras. Otras especies de dinoflagelados que también han sido identificados como productores de STX son *Pyrodinium bahamense var. compressum* y *Gymnodinium catenatum*, así como algunas cianobacterias del género *Anabaena* y *Cylindroespermopsis raciborski* (FAO, 2005).

Los dinoflagelados del género *Alexandrium* de zonas de clima tropical o templado son los principales responsables de la producción de estas saxitoxinas. Los mariscos que se alimentan de estos dinoflagelados acumulan las toxinas, sin sufrir los efectos nocivos de las mismas ya que son resistentes (FAO, 2005). La filtración trasporta las células y los quistes del dinoflagelado al tracto digestivo de los moluscos bivalvos. La digestión, que ocurre en el estómago y en los divertículos, es el proceso mediante el cual las toxinas PSP se liberan y entran a los órganos digestivos. La mezcla de toxinas que se aloja en los tejidos del marisco varía según su tipo, la cepa y la especie del dinoflagelado en cuestión, así como la concentración de toxinas varía con el tiempo y las condiciones ambientales. El 96% de la toxicidad total se encuentra en las vísceras que generalmente constituyen un 30% del peso total de tejido. Particularmente en almejas, la toxina se

acumula rápidamente en las vísceras, para luego disminuir gradualmente (Mons *et al.*, 1998).

#### 1.4.1.1. Mecanismo de acción

En los eucariotas, los canales iónicos de sodio dependientes de voltaje (VGSC<sub>h</sub> por sus siglas en inglés), son grandes proteínas transmembranales (proteína de 250 kDa) que permiten la generación y propagación de rápidas señales eléctricas en las terminales nerviosas en los músculos y el corazón. En ellos se han identificado al menos 9 sitios que funcionan como receptores para ligandos naturales o drogas. En los ecosistemas marinos, numerosas toxinas han evolucionado para perturbar la función de los canales iónicos de sodio (VSSC<sub>h</sub>, por sus siglas en inglés), ya sea por inhibición de paso de la corriente, o modificando los procesos de apertura y cierre del canal. Las saxitoxinas bloquean en las membranas celulares los canales de sodio dependientes de voltaje, interrumpiendo la transmisión del impulso nervioso y produciendo desde síntomas ligeros como entumecimiento o cosquilleo de la boca, hasta la muerte por paro respiratorio (Hall *et al.*, 1990; Kao y Levinson, 1986; Legrand *et al.*, 2001). Todos los derivados de la saxitoxina se ligan al mismo receptor pero con diferentes afinidades, lo que repercute en las diferentes toxicidades de los análogos. Se ha determinado que los enlaces de hidrógeno de la toxina y el sitio de enlace, contribuyen a la energía del enlace. El tiempo promedio de bloqueo del canal depende de la velocidad de disociación y no de la concentración de las toxinas. Sin embargo, la duración de la apertura del canal está relacionada reversiblemente con la concentración de toxinas y depende de la constante de asociación (Mons *et al.*, 1998).

La mayoría de los bivalvos que se alimentan por filtración son relativamente insensibles a las toxinas PSP. Esto se debe a que muchos de ellos cuentan con nervios y músculos operados principalmente por canales de calcio activados por voltaje, en tanto que las STX y otras toxinas bloquean solo los canales de sodio con más potencia (con mucha afinidad). Esto permite a los moluscos continuar alimentándose y convertirse en muy tóxicos. El mejillón común, por ejemplo, puede acumular más de 80 µg SXT en menos de una hora, debido a su gran tolerancia y a que deja de alimentarse de algunas algas tóxicas. Existen ciertas especies de bivalvos que evitan los dinoflagelados tóxicos (*Mercenaria mercenaria*). En estudios en laboratorio se observó que en presencia de *A.*

*tamarensis*, *M. mercenaria* primero retrae los sifones y luego se aísla del ambiente cerrando las válvulas de la concha y no las vuelve a abrir hasta que se agrega agua de mar limpia (Mons *et al.*, 1998).

#### 1.4.2. Toxinas DSP

Son compuestos liposolubles que se acumulan en los tejidos adiposos de los bivalvos. Las toxinas DSP se clasifican en tres grupos según su estructura química. Las toxinas ácidas, formado por varios compuestos lipofílicos que se acumulan en el tejido adiposo; el ácido okadaico (OA) y sus derivados, las dinofisitoxinas (DTX1, DTX2 y DTX3). Estos compuestos son potentes inhibidores de las fosfatasas, por lo que en los humanos están relacionados con la inflamación del tracto intestinal y la diarrea (Hallegraff *et al.*, 1995), reportándose también como teratogénicos (Draisici *et al.*, 1996; Van Egmond *et al.*, 1993). El grupo del OA son toxinas lipofílicas y estables al calor (<100°C), siendo también altamente estables a la congelación (-20 a -80°C) (European Food Safety Authority, 2008). Cualquiera de los análogos puede ser esterificado con ácidos grasos en la posición 7, para formar los acil-OA, conocidos como DTX3. Al parecer, estos acil-derivados son producto del metabolismo de los moluscos bivalvos y poseen actividad como toxina posteriormente a ser des-esterificados por hidrólisis en el tracto digestivo. Los productores principales son especies de dinoflagelados de los géneros *Dinophysis* y *Prorocentrum* de amplia distribución en las costas a nivel mundial. Se han descrito algunos esteres complejos producidos por *Prorocentrum lima*, con una porción trisulfatada, lo que los hace hidrosolubles (Hu *et al.*, 1995). El mismo autor reporto la existencia de dos derivados sulfatados hidrosolubles (DTX4 y DTX5) en el dinoflagelado bentónico *Prorocentrum maculosum*.

Los moluscos acumulan fácilmente toxinas diarreicas asociadas a especies de los géneros *Dinophysis* y *Prorocentrum*, pero poco se sabe acerca de tiempo de retención (Hallegraeff *et al.*, 1995). Existe escasa información, con ella se ha estimado que la absorción no es muy efectiva pero existe tránsito de la toxina hacia varios tejidos y fluidos (contenido intestinal > orina > heces > tejido intestinal > pulmones > hígado > estómago > riñones > sangre). Las concentraciones en tejidos y fluidos pueden detectarse por algunas semanas posteriores a la exposición. No se conoce el metabolismo en mamíferos

#### 1.4.2.1. Mecanismo de acción

El ácido okadaico (OA, por sus siglas en inglés) y las dinofisistoxinas 1 y 2 son moléculas potentes inhibidoras de las fosfatasa intracelulares (tipos 1 y 2A). El OA, cuenta con una estructura macrocíclica mantenida por puentes de hidrógeno intramoleculares, se une a las protein fosfatasa (PPs, por sus siglas en inglés) en una zona hidrofóbica próxima al centro activo del enzima, interaccionando además con zonas básicas en el centro activo (cenapred). La PP1 parece jugar un papel clave en la regulación del metabolismo del glucógeno, contracción del músculo liso, división celular y síntesis de proteínas. Por otro lado, la enzima PP2A (PP2A) participa en el control la mayoría de las principales rutas metabólicas, como glucólisis y metabolismo de lípidos, apoptosis, crecimiento y división celular, transcripción y síntesis de proteínas. El efecto de hiper-fosforilación producido por el OA y DTX-1 puede por tanto, inducir a la muerte celular o contribuir a la transformación celular, promoviendo así la aparición de tumores. El OA ha demostrado efectos genotoxicos en algunos modelos celulares *in vitro*, pero esto no se ha demostrado para las DTX. Mediante estudios de resonancia magnética nuclear (NMR) se ha demostrado que la porción C1-C24 de la molécula de OA adquiere una conformación circular que es muy necesaria para su mecanismo de acción como inhibidor de las PPasas, esta conformación circular solo es posible si el grupo carboxílico de la molécula no está esterificado (Tachibana *et al.*, 1981; Schmitz *et al.*, 1981).

En el presente trabajo, se pretende ampliar la información del estudio de la expresión génica del organismo modelo *Crassostrea gigas* expuesto a dos dinoflagelados tóxicos presentes comúnmente en la región noroeste de México: *Prorocentrum lima* (productor de toxinas DSP) y *Gymnodinium catenatum* (productor de toxinas PSP), a partir de un modelo de exposición que simule un evento FAN. La talla del organismo modelo fue considerada con base en que en la etapa adulta *C. gigas* es relativamente insensible a las toxinas, por lo que se trabajó con juveniles de entre 3 y 5mm. Para efecto del estudio de la expresión génica, se seleccionaron seis genes involucrados en el sistema inmune y de defensa de *C. gigas*: *Proteína de unión a LPS* y



$\beta$ -1,3 glucano (*lbps*), cavortina (*cvt*), proteína 44 (inducida por interferon, *if44*), caspasa 1 (*cp1*), proteína de interacción-Toll (*tlp*) e inmunoglobulina (*inm*).

Se consideró como variables el tiempo de exposición ( 1, 3, 5 y 7 días) y la combinación de tres concentraciones celulares de dinoflagelados tóxicos, TR1 (*G.catenatum*  $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> y *P.lima*  $3 \times 10^2$  cel mL<sup>-1</sup>), TR2 (*G.catenatum*  $1.5 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> y *P.lima*  $1.5 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) y TR3 (*G.catenatum*  $3 \times 10^2$  cel mL<sup>-1</sup> y *P.lima*  $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>). El estudio de la expresión se llevó a cabo mediante la técnica de qPCR.

## 2. ANTECEDENTES

Los efectos de las FAN en estadio larval y embrionario de los moluscos bivalvos son en gran parte desconocidos, aunque algunos estudios sugieren que las FAN pueden afectar al crecimiento y, en ciertos casos, el desarrollo y supervivencia de las larvas (Wikfors y Smolowitz, 1995). Sin embargo, recientemente se han reportado efectos metabólicos en estadios tempranos del desarrollo de *C. virginica* y *C. ariakensis*, que en estas primeras etapas pueden ser más susceptibles a los efectos de las FAN a causa de sus tejidos blandos y expuestos, y a la necesidad de alimento para su desarrollo a larvas maduras a los pocos días de la eclosión (Glibert *et al.*, 2007). Shumway (1990) ha establecido que existe una relación entre eventos FAN y las tasas de mortandad de moluscos bivalvos, describiendo un fenómeno de inmunosupresión con diversas consecuencias, desde una marcada susceptibilidad a los patógenos, hasta una alta incidencia en neoplasias. Recientemente, varios investigadores alrededor del mundo han estudiado los efectos en bivalvos expuestos a dinoflagelados tóxicos (Bardouil *et al.*, 1993; Bauder y Cembella, 2000; Bauder *et al.*, 2001; Pearce *et al.*, 2005; Wikfors, 2005; Hégaret *et al.*, 2007; Stoecker *et al.*, 2008; Campa-Córdova *et al.*, 2009; De las Heras, 2009; Tran *et al.*, 2010); sin embargo, la mayoría de estos estudios se centran en los efectos de comportamiento y/o en su función fisiológica, como resultado de la toxina y/o la exposición a dinoflagelados tóxicos (Vale y Botana, 2008).

Existen muy pocos estudios inmunológicos que evalúan el efecto de la exposición de bivalvos a dinoflagelados tóxicos y, en particular, a los efectos en los mecanismos de defensa de los organismos, estos han sido evaluados sobre distintos agentes como protozoos parásitos, levaduras y bacterias (Estrada, 2005). Algunos de estos estudios han abordado los cambios de expresión génica en *C. gigas* en respuesta a una exposición a microalgas tóxicas y sus toxinas. Estos estudios revelaron altos niveles de expresión en hemocitos de los genes: proteína de shock térmico 70 (Hsp70), citocromo P450 isoforma 356A1 (CYP356A1), y la proteína de unión a ácidos grasos (FABP) expuestos a brevetoxinas (PbTx-2) (Mello *et al.*, 2012). Hégaret y colaboradores (2011), reportaron una disminución en la viabilidad celular cuando hemocitos de *C. gigas* y *C. virginica* fueron incubados con cultivos de *Alexandrium sp.*.

Otros investigadores han reportado que el nivel de expresión de genes involucrados en defensa antioxidante, detoxificación, y respuesta a estrés (GS, GST, Hsp70 y Cu/Zn-SOD) cambia en respuesta a *Prorocentrum lima* (Romero-Geraldo y Hernández-Saavedra, 2012).

Mientras que los microorganismos asociados a la flora normal pueden ser significativamente beneficiosos para el mantenimiento de la homeostasis en el ostión, algunas especies pueden ser altamente virulentas resultando en mortalidades masivas o incluso la extinción de algunas poblaciones de los mismos. Los patógenos de ostiones incluyen protozoos, virus y bacterias, que afectan a todas las etapas de desarrollo (desde larvas a juveniles y ostiones adultos). Como ejemplo, se puede mencionar que las mortalidades de ostiones son frecuentemente asociadas a la presencia de patógenos bacterianos del genero *Vibrio*, particularmente cepas de *V. splendidus* y *V. aestuarianus*. Sin embargo, aún no queda claro si estas bacterias actúan como patógenos primarios o como oportunistas (Schmitt *et al.*, 2012).

En el trabajo realizado por Labreuche y colaboradores (2006) se reportan las respuestas de defensa de *C. gigas* a *V. aestuarianus* a nivel celular y molecular, utilizando PCR en tiempo real y de citometría de flujo. Estos trabajos llevaron al descubrimiento un mecanismo utilizado en las etapas iniciales de la interacción *Vibrio*-huésped: la desregulación del metabolismo oxidativo de los hemocitos mediante el mejoramiento de la producción de especies reactivas de oxígeno y la regulación negativa de la expresión del gen que codifica la superóxido dismutasa extracelular (Cg-ECSOD). Esta desregulación da la oportunidad al patógeno de afectar las funciones de hemocitos y del molusco (Labreuche *et al.*, 2006)

Para obtener un panorama general de los mecanismos moleculares implicados en la respuesta inmune de *C. gigas* para eludir las infecciones por *Vibrio*, recientemente se desarrolló el primer estudio de secuenciación profunda del transcriptoma de hemocitos, las células inmunocompetentes. Haciendo uso de la Expresión Génica Digital (DGE), que generó un catálogo de transcripción de genes regulados de ostras que sobrevivían a la infección con cepas virulentas de *Vibrio* (*V. splendidus* LGP32 y *V. aestuarianus* LPI 02/41) en comparación con una cepa no virulenta (*V. tasmaniensis* LMG 20012; de Lorgeril *et al.*, 2011).

Los trabajos enfocados en particular a biotoxinas marinas son pocos, y hacen énfasis en el efecto de metales pesados y xenobióticos. Aunque se han realizado estudios toxicológicos de interacción con sustancias tóxicas *in vivo*, los reportes han sido de los efectos ante una combinación de toxinas marinas usando como modelo de estudio al ratón (Cuevas, 2013). Un estudio se basó en los efectos de la combinación de ácido okadaico y yexotoxina en linfocitos T, células del sistema inmune (Martín-López *et al.*, 2011). Sin embargo, existen pocos estudios con toxinas PSP y DSP basados en respuestas moleculares (García-Lagunas, 2014; García Lagunas *et al.*, 2012; Romero Geraldo, 2013, Romero-Geraldo y Hernández Saavedra, 2012; López Cuevas, 2013; Matus Hernández, 2013; Romero Geraldo *et al.*, 2014). En un primer reporte de la respuesta a nivel molecular de *C. gigas* expuesto a organismos productores de toxinas marinas (OPTM) del tipo DSP, seis genes de respuesta a estrés fueron analizados mediante RT-PCR semicuantitativo (Romero Geraldo, 2013; Romero-Geraldo y Hernández-Saavedra, 2012) y mediante PCR en tiempo real en exposición de *C. gigas* a (ambos) OPTM del tipo DSP y PSP (López Cuevas, 2013), encontrándose que la exposición unialgal de *C. gigas* a OPTM del tipo PSP o DSP provoca cambios drásticos y diferenciales en la expresión de estos genes con significancia estadística tiempo-dosis dependiente, sugiriendo la alteración en el metabolismo y proceso de detoxificación del ostión. Posteriormente, se estudió el efecto de OPTM del tipo PSP en la tasa de transcripción de genes relacionados con los sistemas de defensa y detoxificación en *C. gigas* (García Lagunas, 2014; García Lagunas *et al.*, 2013). En términos generales, en estos trabajos se encontró que la exposición de *C. gigas* a OPTM del tipo DSP y/o PSP provoca cambios drásticos y diferenciales en la expresión de genes relacionados con el metabolismo. Así mismo, en los reportes en los que se estudió el efecto de la exposición de moluscos bivalvos a microalgas tóxicas en condiciones controladas, probando diferentes concentraciones de dinoflagelados usando modelos de exposición combinada (especie 1 – especie 2), se registraron respuestas de carácter fisiológico, indicando que en la respuesta del ostión influyen tanto la naturaleza y el efecto químico de la toxina del OPTM como la palatabilidad de la especie de dinoflagelado (López Cuevas, 2013). En el 2013, Matus Hernández estudió el efecto de la exposición a organismos del género *Prorocentrum spp* en la expresión de proteínas (principalmente asociadas a respuesta inmune) en *C. gigas* de 3-5 mm. En este estudio se observó la regulación la

expresión de proteínas tales como la proteína Toll de interacción (GI:405969505), la Catepsina L (GI:405958751) y la Cavortina (GI:30039400) en *C. gigas* en función de variables como el tiempo de exposición, la concentración y especie de *Prorocentrum* (Matus Hernández, 2013).

### **2.1. Genes blancos para estudiar la respuesta molecular de la exposición de *C. gigas* a dinoflagelados tóxicos.**

Las bases moleculares de la respuesta de los organismos (moluscos bivalvos) a los dinoflagelados tóxicos son poco conocidas, para ampliar este panorama se seleccionaron seis genes involucrados en el sistema inmune y de defensa de *C. gigas* (Tabla I):

**Tabla I. Genes blanco y su función bioquímica.**

<b>Genes</b>	<b>Función</b>
<i>Proteína de unión a LPS y <math>\beta</math>-1,3 glucano (lgbp)</i>	Participa en la activación de la cascada profenoloxidasa que es una respuesta general de sistema inmune innato en invertebrados.
<i>Cavortina (cvt)</i>	Es una proteína no pigmentada, glicosilada con actividad de inhibición de serin-proteasas, que se asocia con hierro lo que indica que puede funcionar como agente quelante del hierro.
<i>Proteína 44</i> (inducida por interferon, <i>if44</i> )	Proteína implicada en defensa antiviral, actividad antiproliferativa y posiblemente contribuye a la detención del ciclo celular ya que provoca una disminución de GTP celular y suprime la señalización de cinasas reguladas por una señal extracelular.
<i>Caspasa 1 (cp1)</i>	Pertenecen a una familia de cisteín-aspartato proteasas altamente específicas y conservadas; constituyen el núcleo de la maquinaria para la apoptosis celular.
<i>Proteína de interacción-Toll (tlp)</i>	Familia de receptores reconocedores de patrones que tienen un papel central en la detección de patógenos y en la iniciación de la respuesta inflamatoria.

**Tabla I. Continuación**

<i>Inmunoglobulina (inm)</i>	“Immunoglobulin domain cell adhesion molecule”, es una proteína pequeña (81 aa) que contiene un solo dominio similar a Ig que se encuentra normalmente en varias copias en grandes proteínas transmembrana que participan en la adhesión celular y la comunicación de célula a célula. Es la primera identificación de una pequeña molécula en los bivalvos marinos.
------------------------------	--

(García-Lagunas, 2013; Mathews, 2003; Romero-Geraldo, 2012; T. Renault et al., 2011).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Los FANs son fenómenos naturales con diferentes efectos en el ambiente acuático (natural y de cultivo) que afectan tanto a la economía humana como a la salud. Para caracterizar los efectos de los contaminantes en *C. gigas*, se han realizado varios estudios genómicos, sin embargo, la mayoría de la información generada está más relacionada con signos fisiológicos.

Por otra parte, los estudios moleculares de expresión génica de *C. gigas* en respuesta a la exposición de dinoflagelados tóxicos son escasos, y a la fecha aún no se ha podido determinar exactamente el origen de las mortandades masivas de ostión, y mucho menos su correlación potencial con eventos FAN (Romero-Geraldo, 2013). A la fecha solo existen unos cuantos reportes que proporcionan información a nivel molecular del efecto de la exposición de *C. gigas* en respuesta a organismos FAN (Romero Geraldo, 2013; Romero-Geraldo y Hernández-Saavedra, 2012; García Lagunas, 2014; García Lagunas *et al.*, 2013; Romero-Geraldo *et al.*, 2014; López Cuevas, 2013; Matus Hernández, 2013).

Este trabajo pretende ampliar la información existente en expresión génica que se ha estado realizando por el Grupo de Genética Molecular del CIBNOR, determinando el efecto, en la expresión de genes de respuesta inmune, de la exposición de *C. gigas* a una combinación de organismos productores de toxinas PSP y DSP.

#### **4. HIPÓTESIS**

Si la exposición de juveniles de *C. gigas* a *P. lima* y *G. catenatum* (simulando un evento FAN) induce cambios a nivel molecular generando un reconocimiento en el sistema de defensa del ostión, entonces, los cambios en la expresión de algunos genes involucrados en el sistema inmune dependerán de la especie de dinoflagelado (tipo de toxina).



## 5. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto, en la expresión de genes de respuesta inmune, de la exposición de *C. gigas* a organismos productores de toxinas PSP y DSP.

### 5.1. Objetivos Específicos

1. Determinar los candidatos a genes de referencia mediante análisis de estabilidad y normalización.
2. Determinar el efecto combinado de organismos productores de toxinas marinas (PSP < DSP) en la tasa de transcripción de genes de respuesta inmune: LPS-BP (*lbps*), cavortina (*cvt*), proteína 44 (inducida por interferon, *if44*), caspasa 1 (*cp1*), proteína de interacción-Toll (*t1p*) e inmunoglobulina (*imm*).
3. Determinar el efecto combinado de organismos productores de toxinas marinas (PSP = DSP) en la tasa de transcripción de genes de respuesta inmune: LPS-BP (*lbps*), cavortina (*cvt*), proteína 44 (inducida por interferon, *if44*), caspasa 1 (*cp1*), proteína de interacción-Toll (*t1p*) e inmunoglobulina (*imm*).
4. Determinar el efecto combinado de organismos productores de toxinas marinas (PSP > DSP) en la tasa de transcripción de genes de respuesta inmune: LPS-BP (*lbps*), cavortina (*cvt*), proteína 44 (inducida por interferon, *if44*), caspasa 1 (*cp1*), proteína de interacción-Toll (*t1p*) e inmunoglobulina (*imm*).

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### a. Cultivo de microalgas

#### i. *Gymnodinium catenatum*

*G. catenatum* se creció en matraces Fernbach con medio modificado f/2, a  $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , con una irradiación  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$  en un foto periodo de 12:12 horas luz-oscuridad (García-Lagunas, 2013). *G. catenatum* cepa GCCV6, fue obtenida de la Colección de Dinoflagelados Marinos del CIBNOR (CODIMAR, <http://www.cibnor.mx/es/investigacion/colecciones-biologicas/codimar/entrada>).

#### ii. *Prorocentrum lima*

*P. lima* cepa PRL-1 depositada en el Cepario del CIBNOR (poner la clave del laboratorio), fue aislada cerca de la isla El Pardito, en la Bahía de La Paz (Heredia-Tapia *et al.*, 2002). *P. lima* se creció en matraces Fernbach con medio modificado f/2 y se mantuvo a una temperatura de  $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , con una irradiación  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$  en un foto periodo de 12:12 horas luz-oscuridad (López Cuevas, 2013).

#### iii. *Isochrysis galbana*

*I. galbana* cepa ISG-1, que se utiliza de forma rutinaria en la acuicultura como alimento para los bivalvos, fue proporcionada por el Laboratorio de Alimento Vivo del CIBNOR (poner la clave del laboratorio), para ser utilizada en el presente trabajo como dieta de control. Los cultivos se desarrollaron en bolsas de plástico con medio f/2, se mantuvieron a  $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , bajo una iluminación constante de  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$  en un foto periodo de 12:12 horas luz-oscuridad (García-Lagunas, 2013).

### ***b. Crassostrea gigas***

Los juveniles de *C. gigas* (3–5 mm), se obtuvieron del laboratorio de producción de semilla de ostión “Acuicultura Robles SPR de RI” (Las Botellas, B.C.S.). Una vez obtenidos de la granja y ya en el laboratorio, los organismos se aclimataron durante 14 días en recipientes plásticos de 10 L con agua de mar filtrada (0.45 µm), con flujo de oxígeno, temperatura promedio de 21°C y salinidad controlada (35 ups) en el Laboratorio Húmedo de Seguridad Biológica del CIBNOR (LHSB). La dieta de mantenimiento consistió en *I. galbana*  $1.5 \times 10^5$  cels.mL<sup>-1</sup>, libre de bacterias, obtenida del Laboratorio de Alimento Vivo del CIBNOR (Romero-Geraldo, 2013; López Cuevas, 2013).

### ***c. Diseño experimental***

#### *i. Bioensayo en juveniles (3-5 mm) de C. gigas*

Para dar seguimiento completo a los perfiles de expresión génica, en los bioensayos se usaron combinaciones de dinoflagelados tóxicos a concentraciones (Tabla I) que se reportan como no generadoras de signos de efectos severos tales como necrosis y mortalidad en trabajos previos (García-Lagunas, 2014; Romero-Geraldo, 2013). Los bioensayos se llevaron a cabo en el Laboratorio Húmedo de Seguridad Biológica, con acceso restringido y bajo condiciones de temperatura e iluminación controladas.

**Tabla II. Tratamientos**

<b>Tratamiento</b>	<b><i>P. lima</i> (cel.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b><i>G. catenatum</i> (cel.mL<sup>-1</sup>)</b>
<i>TR1</i>	$3 \times 10^2$	$3 \times 10^3$
<i>TR2</i>	$1.5 \times 10^3$	$1.5 \times 10^3$
<i>TR3</i>	$3 \times 10^3$	$3 \times 10^2$

Esta estrategia metodológica permitió considerar el análisis de tres puntos equidistantes durante la simulación del desarrollo de un evento FAN, representando el fenómeno de sucesión de especies (Fig. 2), lo que constituye un sistema complejo de exposición, parecido a los que ocurre en la naturaleza.

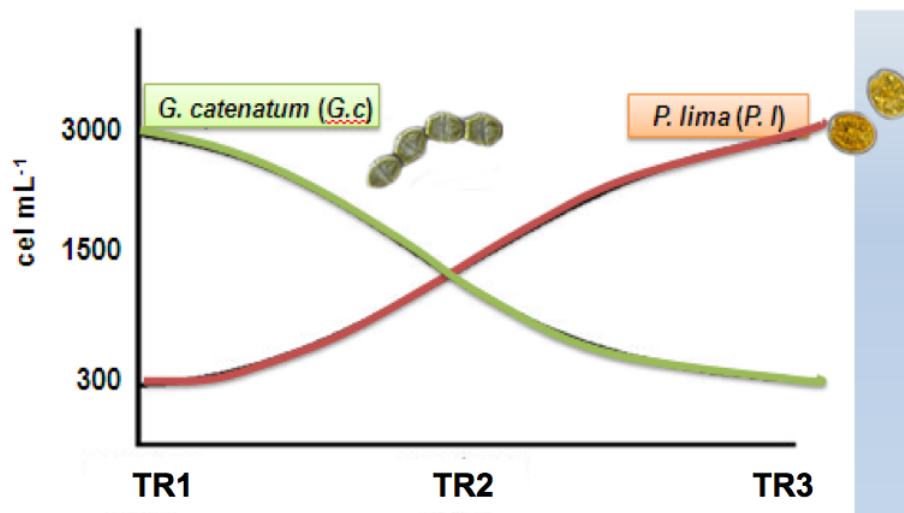


FIGURA 2. Representación esquemática del sistema de exposición (Tomado de López Cuevas, 2013).

Para la realización del bioensayo de exposición, se usaron juveniles de entre 3 a 5 mm. Los organismos se colocaron en 21 unidades experimentales, tres unidades (réplicas) para cada tratamiento (TR1, TR2 y TR3) y tres unidades (réplicas) para el control: C1, *C. gigas* alimentados con *I. galbana*. A la par del bioensayo se preparó un número igual de unidades experimentales en las que se mantuvieron organismos de recambio. En cada unidad experimental (frascos de vidrio de 100 mL, previamente esterilizados) se colocaron 50 organismos en un volumen de 50 mL de agua de mar filtrada.

Como se muestra en la Tabla III, el bioensayo consistió de la exposición de las ostiones a los diferentes tratamientos con las microalgas, realizando 5 muestreos al tiempo 0 ( $t_0$ ), inicio del experimento, a las 24h (1d), al día 3 (3d), al día 5 (5d) y al día 7 (7d). En cada muestreo se colectaron 5 organismos de cada réplica de cada tratamiento y de los controles (Tabla II). Los organismos colectados se enjuagaron con agua de mar filtrada estéril, y se mantuvieron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior procesamiento.

Con las muestras tomadas se hicieron homogenados para la extracción de ARN total, que se utilizó para sintetizar ADNc para determinar mediante qPCR los niveles de expresión de los genes de estudio.

**Tabla III.** Bioensayo de exposición combinada de dinoflagelados tóxicos.

Unidad de recambio	Unidad de muestreo	cel mL <sup>-1</sup>	Replica (no. organismos)	Tiempo de muestreo				
				0	1	3	5	7
C1'	C1	<i>Ig</i> $7.5 \times 10^5$	1 (50)	5	5	5	5	5
			2 (50)					
			3 (50)					
			2 (50)					
			3 (50)					
TR1'	TR1	<i>Gc</i> $3 \times 10^3$	1 (50)	5	5	5	5	5
			2 (50)					
			<i>Pl</i> $3 \times 10^2$					
			3 (50)					
TR2'	TR2	<i>Gc</i> $1.5 \times 10^3$	1 (50)	5	5	5	5	5
			2 (50)					
			<i>Pl</i> $1.5 \times 10^3$					
			3 (50)					
TR3'	TR3	<i>Gc</i> $3 \times 10^2$	1 (50)	5	5	5	5	5
			2 (50)					
			<i>Pl</i> $3 \times 10^3$					
			3 (50)					

\*Los tratamientos TR1, TR2 y TR3 también incluyen a *I. galbana* a una concentración de  $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>

#### **d. Oligonúcleotidos para qPCR**

Para el análisis de qPCR, se usaron oligonucleótidos diseñados previamente por Romero-Geraldo (2013) y García-Lagunas (2014) tomando como referencia las secuencias de genes de *C. gigas* previamente seleccionados (Tabla IV) y que se encuentran depositadas en el GeneBank.

**Tabla IV.** Relación de genes para el análisis de qPCR.

Nombre (gen)	Primer	Secuencia 5'-3'	Amplicón (pb)	GenBank
<i>Proteína de interacción Toll</i>	Cg-tlp-Fw Cg-tlp-Rv	GGCTTTCTCTATCCGTGGTA GTTCTTGGCACCGTTCTAAG	-----	405969505
<i>Caspasa 1</i>	Cg-cp1-Fw Cg-cp1-Rv	ACTACAGAAAGCCGCGAAT GATCATTCTGTGCTACCCCC	87	HQ425703
<i>Proteína de unión a LPS y <math>\beta</math>-1,3 glucano</i>	Cg-lgbp-Fw Cg-lgbp-Rv	TTGTCCAGTTCTCCAGCTTCC GACTCTGGAATGGGATGAAGAAC	108	CB617438
<i>Cavortina</i>	Cg-cvt-Fw Cg-cvt-Rv	ATCTCCATCTCCATGACGACG CGATGACAGCGGTATGAGAGG	144	AY256853
<i>Proteína inducida por interferón 44</i>	Cg-if44-Fw Cg-if44-Rv	CATACTGGACGGCAACATACC ATGAATCCTGTCCCCGAGAT	109	FJ440108
<i>Inmonoglobulina b</i>	Cg-inm Fw Cg-inm Rv	ATTTACAGCCGCTCCCATTCT GCATCTCATTCGGTAAGGACTG	113	EU678312

#### ***e. Extracción de ARN total y síntesis de ADN complementario***

Se realizó la extracción de ARN de las muestras utilizando el método de Chomczynski y Sacchi (1987) modificado (solución AGPC). Una vez obtenido, se determinó la calidad y cantidad del ARN total en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) determinando la absorbancia a 260 y 280 nm. La integridad del ARN se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (TBE 1X / DEPC), y la pureza mediante PCR directo utilizando primers universales para el gen 28S ribosomal cg28SF, 5'-GCAGGAAAAGAACTAAC-3'; cg28SR, 5'-CCTCTAAGTGGTTTCAC-3' (XXX ng. $\mu$ L<sup>-1</sup>) y 1  $\mu$ L de cada muestra de ARN sin diluir (aprox. 1400 ng. $\mu$ L<sup>-1</sup>). Como control positivo se utilizó una muestra de ADN de músculo de *C. gigas* y como control negativo la misma mezcla de reacción sin ADN. Una vez verificada la ausencia de ADN, se realizó la síntesis de ADN complementario (ADNc) con el Kit de Promega® Improm-IITM Reverse Transcription System, utilizando 4  $\mu$ L de ARN (250 ng. $\mu$ L<sup>-1</sup>) y 1  $\mu$ L de primer dT por cada reacción.

### ***f. PCR en tiempo real (qPCR)***

#### *i. Estandarización de la eficiencia para qPCR*

El análisis de la eficiencia es crucial en la cuantificación de la expresión de genes mediante qPCR, dado que esta aproximación está fuertemente influenciada por los componentes de la reacción (Pfaffl, 2004). Un ensayo robusto y preciso de qPCR está usualmente correlacionado con una alta eficiencia. Esto es particularmente importante al reportar concentraciones de ARNm de los genes diana en relación con los genes de referencia (Bustin, 2009).

La eficiencia (E) del PCR en tiempo real se define como la capacidad de la reacción para duplicar el número de copias de las cadenas de ADN o ADNc en cada ciclo (Bustin, 2002). La eficiencia de amplificación debe ser establecida por medio de curvas de calibración, dado que la calibración proporciona una indicación sencilla, rápida y reproducible de la eficiencia media del PCR, además de la sensibilidad analítica y la robustez del ensayo (Bustin, 2009). Esta eficiencia se calcula a partir de las pendientes de las curvas estándar obtenidas después de realizar diluciones seriadas con las reacciones de PCR de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$E=10^{-1/\text{pendiente}}-1 \text{ (Pfaffl, 2004)} \quad [1]$$

En este trabajo se determinó la eficiencia del qPCR para cada uno de los oligonucleótidos de los diferentes genes evaluados. A partir de cuatro diluciones seriadas (1:5), se preparó una mezcla de ADNc (cDNA mix) que contenía el ADNc de los diferentes controles y tratamientos. Para llevar a cabo la qPCR, se utilizaron los siguientes componentes por reacción: 1.5  $\mu\text{L}$  de Buffer 10x, 0.75  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50 mM), 0.5  $\mu\text{L}$  de dNTPS (2mM), 0.75  $\mu\text{L}$  de Eva Green (20X) (Biotium, CA), 0.3 U de Platinum® Taq DNA Polymerase, 1.4  $\mu\text{L}$  de oligonucleótidos (Forward y Reverse), 5  $\mu\text{L}$  de ADNc (cDNA mix) y 5.8  $\mu\text{L}$  de agua miliQ en un volumen final de 15  $\mu\text{L}$ , y como control negativo agua miliQ.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización a

95°C/10 min; 40 ciclos de desnaturalización a 95°C/15 s, alineamiento 61°C/1 min, polimerización a 74°C/20 s. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un Termociclador RotorGene 6000 construyendo las curvas de disociación de 65°C a 95°C con un incremento de 1°C cada 4 s. Se verificó que la amplificación de los genes mostrara un solo pico en las curvas de disociación para cada gen (productos únicos y específicos).

Se construyó una curva estándar para cada uno de los genes de referencia así como para los genes diana. Las amplificaciones de cada dilución se realizaron por triplicado, utilizando el ADNc de las muestras obtenidas del bioensayo con juveniles de *C. gigas* de 3-5 mm.

#### *ii. Análisis de estabilidad de los candidatos a genes de referencia*

La normalización es un componente esencial de un ensayo fiable de qPCR ya que este proceso controla las variaciones de rendimiento de la extracción y la transcripción inversa, además de la eficiencia de la amplificación, lo que permite tener comparaciones de las concentraciones de ARNm a través de diferentes muestras. El uso de genes de referencia como controles internos es el método más común de normalización. La normalización contra un solo gen de referencia no es aceptable a menos que el investigador presente clara evidencia que confirme su expresión invariante bajo las condiciones experimentales descritas (Bustin, 2009). Por lo tanto, la correcta elección de los genes de referencia para la normalización de qPCR es esencial. Se ha demostrado que el uso de un sólo gen como gen de referencia es susceptible a tener errores en la interpretación de los resultados. Como consecuencia, para normalizar las expresión de los genes es necesario utilizar más de un gen de referencia, por lo que es necesario validar genes de referencia para cada condición experimental (Huggett *et al.*, 2005). El número óptimo de elección de genes de referencia se debe determinar experimentalmente por los métodos reportados (Vandesompele *et al.*, 2002, Andersen *et al.*, 2004 y Pfaffl, 2004).



El cálculo de Vandesompele (GeNorm) está basado en el principio de que la tasa de expresión de dos genes de referencia ideales es idéntica en todas las muestras independientemente de las condiciones experimentales o tipo de células. Entonces, la variación en la tasa de expresión de dos genes control reflejara el hecho de que uno de estos genes no es expresado constantemente con un incremento de la tasa de variación correspondiente al decremento en la estabilidad de expresión reportado como valores de M, genes con valores más bajos de M ( $<1.5$ ) tienen la expresión más estable.

Por otro lado, NormFinder (Andersen *et al.*, 2004), utiliza un modelo que analiza las varianzas en los datos de expresión lo cual permite hacer una evaluación entre grupos e “intra grupos”; este análisis es más robusto relacionado al tamaño de muestra y se evalúa la estabilidad de cada gen independientemente de otros genes. El objetivo de NormFinder es la identificación de genes de referencia candidatos con una variación entre grupos lo más cercana a cero como sea posible, mientras que al mismo tiempo tiene una pequeña variación dentro de los grupos.

Para realizar la elección de los genes de referencia (GR) se probaron los 5 genes usados más comúnmente (Tabla V). Los componentes de reacción así como las condiciones de amplificación para las curvas estándar fueron descritas en el apartado anterior (6i). Una vez determinadas las curvas estándar, los GR se corrieron con las muestras de bioensayo (C1, control con *I. galbana*  $3 \times 10^4$  cel mL<sup>-1</sup>; y los tratamientos descritos en la Tabla I).

**Tabla V.** Relación de candidatos a genes de referencia y sus características.

Nombre (gen)	Primer	Secuencia 5'-3'	Amplicón (pb)	GenBank
Subunidad ribosomal 28S	Cg-28s F Cg-28s R	GGAGTCGGGTTGTTTGAGAATGC GTTCTTTTCAACTTTCCTCACGG	114	AY632555
Gliceraldehído3-fosfato deshidrogenasa	Cg-GAPDH F Cg-GAPDH R	GTTCAAATATGATTCAACTCACGG TGGATCCCCTTCGCAATATACG	109	AJ544886
Tubulina β5	Cg-TUB F Cg-TUB R	AGCAGA TGTCGT AGAGAGCTTC TGAACACA TTCTCCGTTGTCCC	144	CB617442

Actina (G1A)	Cg-ACT F Cg-ACT R	T ACTCTTTCACCACCACAGCCG TAGAGATGAGGATGAAGCAGCAG	117	AF026063
Factor de elongación 1- $\alpha$	Cg-EF-1 $\alpha$ F Cg-EF-1 $\alpha$ R	ACCA T ACAGTGAGGCTCGA TTC GTGGAAGCCTCAATCATGTTATC	138	AB122066

Posteriormente, para analizar la estabilidad de los genes de referencia candidatos, los valores de Ct (número de ciclos en los que la curva de fluorescencia atraviesa el umbral de detección establecido) de cada gen, fueron analizados utilizando los programas NormFinder (Andersen *et al.*, 2004) y GeNorm (Vandesompele *et al.*, 2002 utilizando la liga RefFinder:

<http://www.leonxie.com/referencegene.php?type=reference#>.

Una vez que se estandarizaron las condiciones para el qPCR y, fueron seleccionados los genes de referencia a utilizar, se continuó con la cuantificación de la expresión de los genes blanco.

### *iii. Análisis cuantitativo de expresión génica*

El análisis cuantitativo de la expresión génica se llevó a cabo mediante cuantificación relativa. La cuantificación relativa describe el cambio en la expresión del gen blanco relacionado a un grupo referente, como un control o una muestra al tiempo cero (Livak y Schmittgen, 2001). El método más común para la cuantificación relativa es el de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Este método se basa en dos supuestos: el primero es que la reacción está ocurriendo con el 100% de eficiencia; en otras palabras, que con cada ciclo de PCR, la cantidad de producto se duplica. Este supuesto es también una de las razones de usar un bajo número de ciclos cuando la reacción se encuentra todavía en fase exponencial. El segundo supuesto es que hay un gen (o genes) que son expresados a un nivel constante entre muestras; este control endógeno se utiliza para corregir cualquier diferencia en la carga de la muestra (VanGuilder, 2008). Para la realización de esta tesis se utilizó el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , dado que este método no requiere la eficiencia de reacción como factor de corrección y expresa la proporción obtenida de la relación entre

los valores Ct de la muestra y los valores Ct del control (Pfaffl, 2004).

Se realizaron ANOVAs de dos vías para cada gen (por tratamiento y tiempo de exposición), además de pruebas a *posteriori* para encontrar las diferencias significativas, utilizando la prueba Fisher (LDS); en todos los casos se usó una significancia estadística de  $p < 0.05$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Bioensayo en juveniles de *C. gigas* (3-5mm)

Se realizó la toma de los organismos requeridos para cada muestreo de acuerdo al punto 6.3.1; a continuación se enjuagaron con agua destilada y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior uso. Cabe mencionar que durante el bioensayo no se presentó mortalidad de los organismos en ninguna de las réplicas de los tratamientos y el control.

#### 7.1.1. Extracción de ARN total y síntesis de ADN complementario

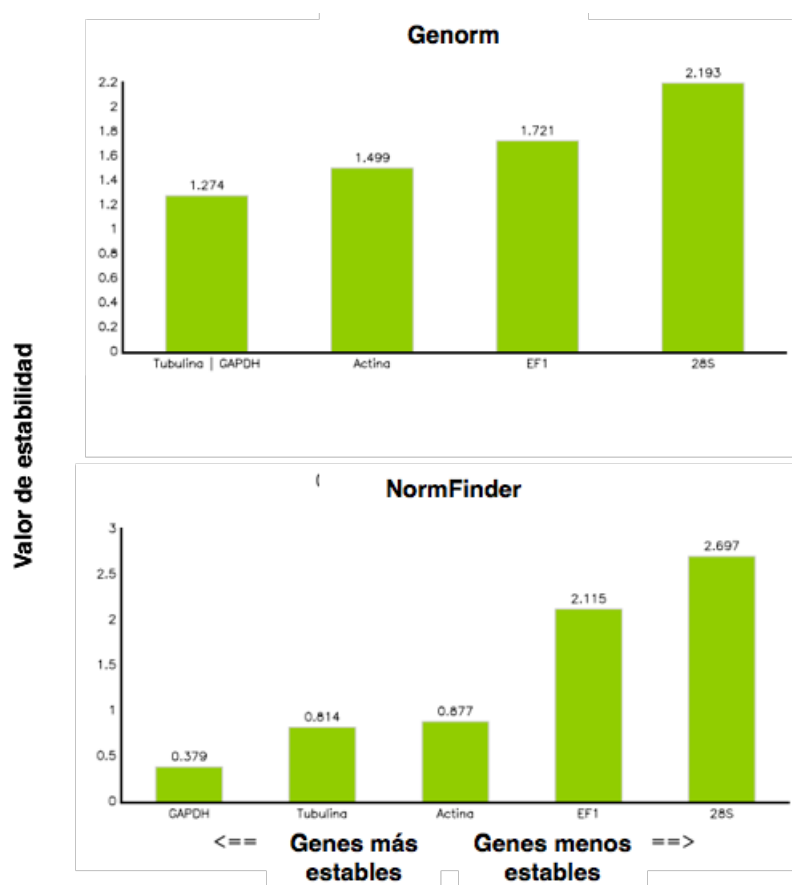
El ARN total de las muestras se extrajo por el método de tiocianato de guanidina (Chomczynski y Sacchi, 1987). La concentración de ARN se determinó mediante espectrofotometría-UV con el espectrofotómetro Nanodrop 2000® (Thermo Scientific) utilizando las lecturas de la absorbancia a 260 y 280 nm. La integridad del ARN se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (TBE 1X / DEPC). La pureza del ARN total se verificó mediante PCR directo utilizando el gen 28S ribosomal. Posteriormente, el ARN total se utilizó para la síntesis de ADNc con el kit Improm-IITM Reverse Transcription System (Promega®).

### 7.2. PCR en tiempo real (qPCR)

#### 7.2.1. Análisis de estabilidad de los candidatos a genes de referencia

Para el análisis de estabilidad se los GR se consideraron cinco genes candidatos de referencia (TUB, ACT, GAPDH, EF1- $\alpha$  y 28s) en juveniles de *C. gigas* (3-5 mm) expuestos a los dinoflagelados tóxicos *G. catenatum* y *P. lima*. Los valores de Ct se encontraron distribuidos entre 17.11 para 28s y 32.95 para GAPDH. Las curvas estándar tuvieron coeficientes de correlación ( $R^2$ ) mayores a 0.96. La especificidad de la amplificación se observó por el análisis de las curvas de disociación.

El análisis se realizó utilizando la liga RefFinder (con base a los programas NormFinder, GeNorm y BestKeeper) considerando los datos de Ct. Se encontró que TUB, GAPDH Y ACT (Figura 3) son los genes de referencia más adecuados para la normalización de la expresión de *C. gigas* alimentados con *P. lima* y *G. catenatum* en comparación con los ostiones alimentados con el control no tóxicos, debido a que fueron los que presentaron valores de M por debajo de 1.50 (Tabla VI) .



**Figura 3.** Promedio de la estabilidad de la expresión de genes candidatos de referencia en juveniles de *C. gigas* (3-5mm), calculados con los softwares GeNorm y NormFinder.

**Tabla VI.** Clasificación de los genes de referencia candidatos por Genorm, NormFinder y BestKeeper. Valores más bajos de *M* indican una mayor estabilidad en la expresión.

Gen	Genorm	NormFinder
<i>β tub</i>	1.39	0.90
<i>gapdh</i>	1.39	0.48
<i>act</i>	1.49	0.80
<i>efl α</i>	1.73	2.09
<i>28s</i>	2.19	2.67

### 7.2.2. Análisis cuantitativo de expresión génica

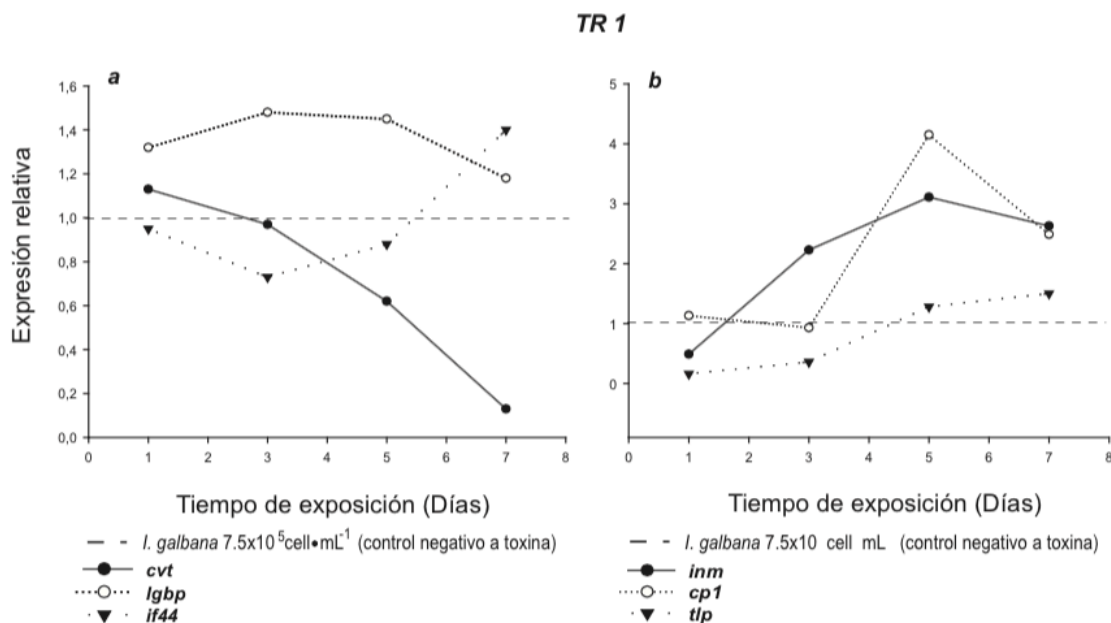
7.2.2.1. Análisis de la expresión para el efecto combinado PSP > DSP (TR1) de organismos productores de toxinas marinas en la tasa de transcripción de genes de respuesta inmune.

Se estudió la respuesta durante 7 días de *C. gigas* retado con una combinación de células de *G. catenatum* (en mayor proporción) y de *P. lima* (menor proporción), tratamiento 1, por medio del análisis en los niveles de expresión de los siguientes genes de respuesta inmune (genes blanco): proteína de unión a LPS y β-1,3 glucano (*lgbp*), cavortina (*cvt*), proteína 44 (inducida por interferon, *if44*), caspasa 1 (*cp1*), proteína de interacción-Toll (*tlp*) e inmunoglobulina (*inm*). Los niveles de expresión de cada gen blanco, en las condiciones experimentales probadas, se compararon con el “control negativo no tóxico” (únicamente *I. galbana*) considerándolo como una “línea basal”.

Durante el bioensayo se observaron cambios en los niveles de expresión (respecto a su condición basal) en los genes: *if44*, *cvt*, *inm* y *cp1* (Figura 4).

En la figura 4(a) se puede observar claramente una disminución en los niveles de transcritos del gen *cvt* a partir del 3er día de exposición presentándose más marcada en los días 5 y 7 del bioensayo. Durante todos el bioensayo, la expresión de *lgbp* se

mantuvo estable (sin una variación significativa) un poco por arriba del nivel basal. En cuanto a *if44* los niveles de transcrito estuvieron por debajo del nivel basal durante los primeros 5 días de exposición para finalmente sobre-expresarse al 7mo día.



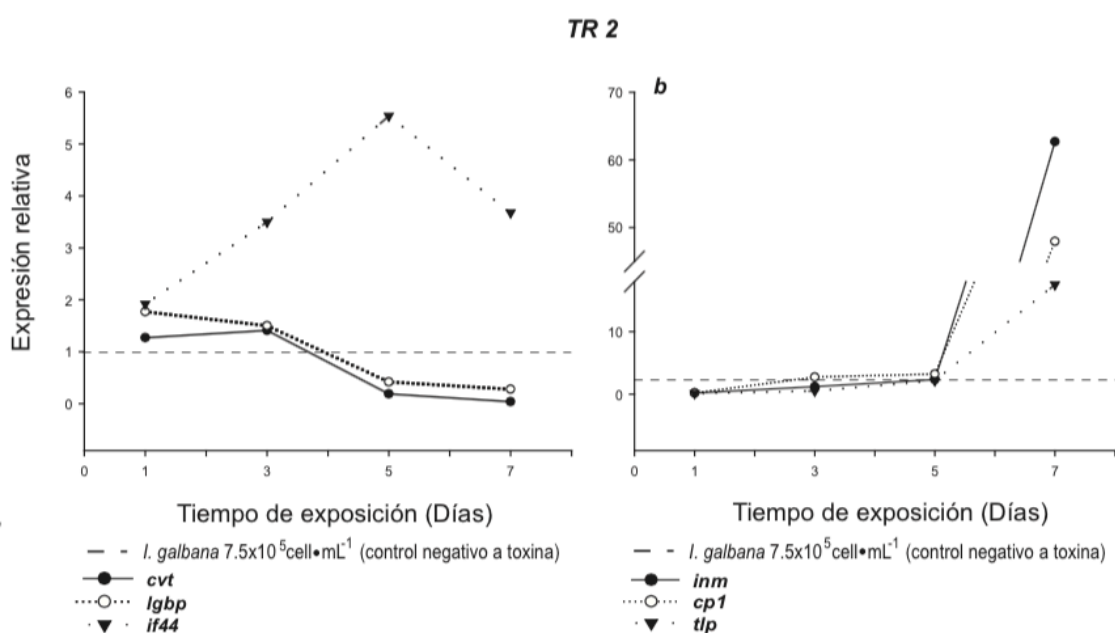
**Figura 4.** Expresión relativa de **a)** cavortina (*cv*t), proteína de unión a LPS y  $\beta$ -1,3 glucano (*lgbp*) y proteína inducida por interferón 44 (*if44*); y **b)** inmonoglobulina (*inm*), caspasa 1 (*cp1*) y proteína de interacción-Toll (*tlp*) en *C. gigas* expuestos al TR1 (*G. catenatum* 3X10<sup>3</sup> P.lima 3X10<sup>2</sup>). El asterisco marca las diferencias entre un tratamiento determinado y el control no toxico ( $p < 0.05$  en Fisher's LSD).

La proporción de transcritos para del gen *tlp* (Figura 4b) fue dependiente del tiempo de exposición, observándose un aumento del nivel de transcritos desde el día 1 hasta el día 7. El gen *cp1* presenta una sobre-expresión particularmente notable al día 5, y empieza a disminuir al último día de exposición. Sin embargo el gen *inm* presenta un incremento constante en sus niveles de transcritos durante los primeros 5 día de exposición para disminuir al 7mo día.

En general se puede observar una tendencia particularmente notable (tiempo-dependiente) para los genes *cv*t, *cp1* e *inm* para las condiciones experimentales del TR1 donde la concentración de *G. catenatum* es mayor que la de *P. lima*.

7.2.2.2. Análisis de la expresión para el efecto combinado PSP = DSP (TR2) de organismos productores de toxinas marinas en la tasa de transcripción de genes de respuesta inmune.

Se estudió la respuesta durante 7 días de *C. gigas* retado con una combinación de igual proporción de células de *G. catenatum* y *P. lima*, tratamiento 2, a través del análisis en los niveles de expresión de *lgbp*, *cvt*, *if44*, *cp1*, *tlp* e *inm*. Los cambios en los niveles de expresión de estos genes se muestran en la Figura 5.



**Figura 5.** Expresión relativa de **a**) cavortina (*cvt*), proteína de unión a LPS y  $\beta$ -1,3 glucano (*lgbp*) y proteína inducida por interferón 44 (*if44*); y **b**) inmonoglobulina (*inm*), caspasa 1 (*cp1*) y proteína de interacción-Toll (*tlp*) en *C. gigas* expuestos al Tratamiento 2, *G.catenatum*  $1.5 \times 10^3$  *P.lima*  $1.5 \times 10^3$ . El asterisco marca las diferencias entre un tratamiento determinado y el control no toxico ( $p < 0.05$  en Fisher's LSD).

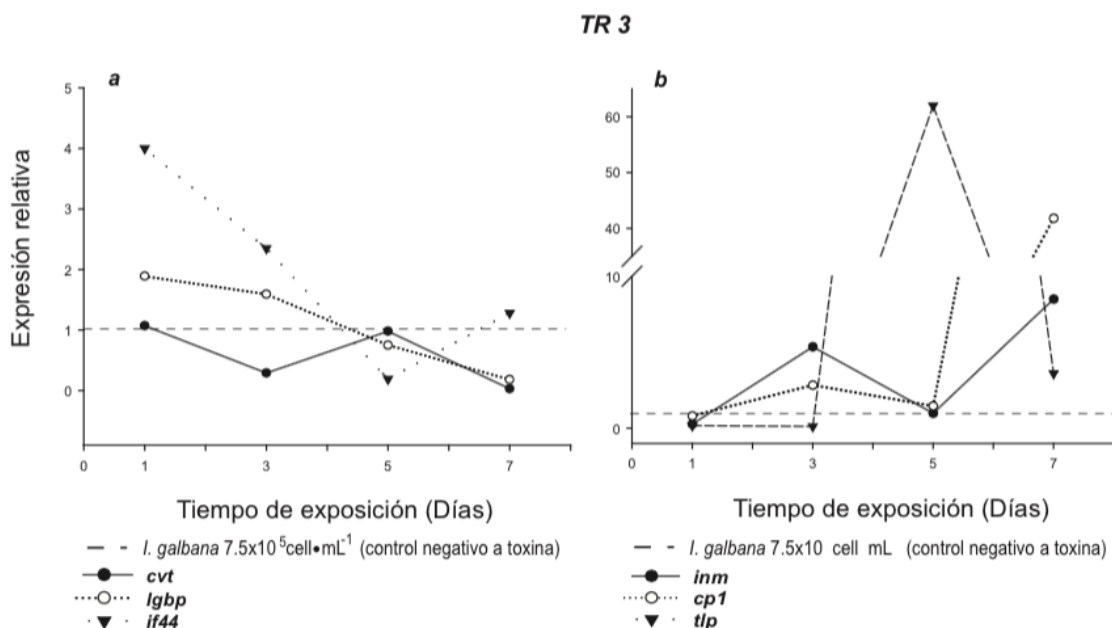
En los genes *cvt* y *lgbp* (Figura 5a) se pudo observar un comportamiento similar en los niveles de expresión, donde a partir del día 3 de exposición los niveles de transcritos empezaron a disminuir hasta quedar sub-expresados en los últimos dos días del bioensayo, mientras que un comportamiento totalmente opuesto se presentó en el gen *if44*, en el que se observa una marcada sobre-expresión hasta el día 5, disminuyendo posteriormente al final del bioensayo.



En la Figura 5b todos los genes (*inm*, *cp1* y *tlp*) observan un comportamiento similar durante todo el bioensayo, sin embargo, hay un marcado incremento en los niveles de expresión (20 veces más que el nivel basal), siendo particularmente notable para *inm* con casi 70 veces más transcritos que en la condición basal.

### 7.2.2.3. Análisis de la expresión para el efecto combinado PSP < DSP (TR3) de organismos productores de toxinas marinas en la tasa de transcripción de genes de respuesta inmune.

Se estudió la respuesta durante 7 días de *C. gigas* retado con una combinación de células de *G. catenatum* (en menor proporción) y de *P. lima* (en mayor proporción), tratamiento 3 a través del análisis en los niveles de expresión de *lgbp*, *cvt*, *if44*, *cp1*, *tlp* e *inm*. Los cambios en los niveles de expresión de estos genes se muestran en la Figura 6.



**Figura 6.** Expresión relativa de **a**) cavortina (*cvt*), proteína de unión a LPS y  $\beta$ -1,3 glucano (*lgbp*) y proteína inducida por interferón 44 (*if44*); y **b**) inmonoglobulina (*inm*), caspasa 1 (*cp1*) y proteína de interacción-Toll (*tlp*) en *C. gigas* expuestos al Tratamiento 3 (*G. catenatum* 3X10<sup>2</sup> *P. lima* 3X10<sup>3</sup>). El asterisco marca las diferencias entre un tratamiento determinado y el control no toxico ( $p < 0.05$  en Fisher's LSD).

El gen *cvt* muestra una sub-expresión moderada a los días 3 y 7 de exposición al TR3, en el cual se encuentra en mayor cantidad el dinoflagelado tóxico *P. lima*. Los niveles de transcrito del gen *lgbp* van disminuyendo de forma constante, hasta verse sub-expresado en el día 7 del bioensayo. Mientras que el comportamiento de la transcripción del gen *if44* es opuesto el de los anteriores, encontrándose una marcada sobre-expresión al día 1, disminuyendo hasta el día 5 en el que se encontró sub-expresado (Figura 6a).

En la Figura 6b se observan dos picos de sobre-expresión moderada para el gen *inm* en los días 3 y 7, mientras que a los días 1 y 5 se encuentra en un nivel de expresión similar al basal. Para el gen *cp1* sobresale un pico de expresión al día 7 de exposición, alrededor de 40 veces más que su condición basal. El gen *t1p* demuestra un comportamiento fluctuante, en donde los primeros tres días de exposición se encuentra sub-expresado, con un marcado incremento observándose un pico de expresión 60 veces más que el nivel basal al día 5, y una disminución notable al 7mo día de exposición.

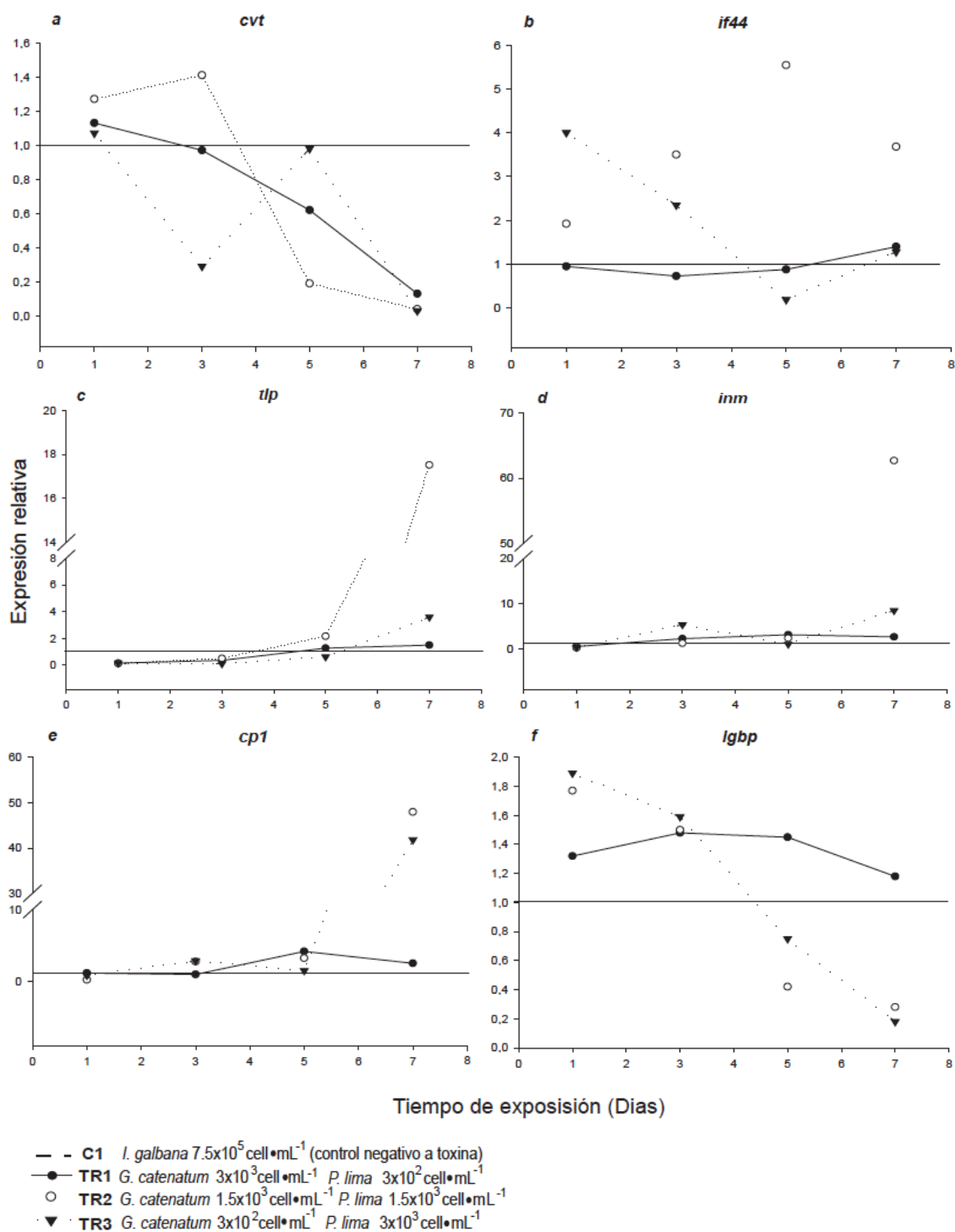
En la Figura 7 se muestra un cuadro comparativo entre los diferentes tratamientos bajo la perspectiva de cada uno de los genes blanco analizados, con la finalidad de mostrar un panorama integrado.

Como se puede observar en la Figura 7a hay una tendencia en la disminución de los transcritos de *cvt* conforme pasa el tiempo de exposición, siendo más evidente a partir del 3<sup>er</sup> día. En el gen *if44* (Figura 7b), para el TR1, no se observaron variaciones significativas en los niveles de expresión, sin embargo, es interesante el comportamiento opuesto entre los tratamientos TR2 y TR3, donde en el primero se observa claramente un pico de expresión en el día 5 de exposición, y para el tratamiento TR3 desde el primer día se encuentra sobre expresado para decaer súbitamente al 5<sup>to</sup> día de exposición.

Para el gen *t1p* en la Figura 7c, en los tres tratamientos se observa un aumento gradual en los transcritos pero particularmente en el tratamiento TR2 a partir del 5<sup>to</sup> día de exposición hay sobre expresión que alcanza hasta 18 veces más del nivel basal para el 7<sup>mo</sup> día de exposición. Un comportamiento similar se puede apreciar también para el gen *inm* (Figura 8b), donde el nivel de expresión en el tratamiento TR2 llega a tener 60 veces más transcritos que el nivel basal.

El gen *cp1* (Figura 7e) se encuentra sobre expresado en los tratamientos TR2 y TR3 a partir del día número 5 de exposición y se mantiene así hasta el último día del bioensayo, con niveles de expresión 40 y 50 veces el nivel basal.

Por último, en la Figura 7f , el gen *lgbp* se mantiene estable por arriba del nivel basal de expresión en el tratamiento TR1, mientras que en los tratamientos TR2 y TR3 los niveles de transcritos decaen conforme pasa el tiempo de exposición.



**Figura 7.** Expresión relativa de **a)** cavortina (*cvt*), **b)** proteína inducida por interferón 44 (*if44*) **c)** proteína de interacción-Toll (*t1p*), **d)** inmonoglobulina (*inm*), **e)** caspasa 1 (*cp1*) y **f)** proteína de unión a LPS y  $\beta$ -1,3 glucano (*lgbp*) en *C. gigas* expuestos al los tratamientos TR1, TR2 y TR3. El asterisco marca las diferencias entre un tratamiento determinado y el control no toxico ( $p < 0.05$  en Fisher's LSD).

\*Nota: las desviaciones estándar se encuentran en la Tabla V en la sección de anexos, esto con la finalidad de observar con mayor claridad las gráficas en este apartado.

## 8. DISCUSIÓN

En esta tesis se determinó el efecto en la expresión de genes de respuesta inmune, de la exposición de *C. gigas* a organismos productores de toxinas PSP y DSP. Los resultados obtenidos serán discutidos en relación al estado del conocimiento actual de genes involucrados en el sistema de defensa e inmunidad innata en invertebrados.

Las bases moleculares de la respuesta de los organismos (moluscos bivalvos) a los dinoflagelados tóxicos son aún poco conocidas, para ampliar este panorama se seleccionaron seis genes involucrados en el sistema inmune y de defensa de *C. gigas*: *Proteína de unión a LPS y  $\beta$ -1,3 glucano (lgbp)*, *Cavortina (cvt)*, *Proteína 44* (inducida por interferon, *if44*), *Caspasa 1 (cp1)*, *Proteína de interacción-Toll (tlp)* e *Inmunoglobulina (inn)*. La expresión relativa de estos genes (*lgbp*, *cvt*, *if44*, *cp1*, *tlp* e *inn*) fue examinada en organismos (*C. gigas*, 3-5mm) alimentados con las dietas combinadas de *G. catenatum* + *P. lima*, en diferentes proporciones (TR1, TR2 y TR3) comparados con el control (C1) de organismos alimentados solo con *I. galbana*.

Los cambios observados en el nivel de expresión de los genes seleccionados sugieren, en general, una relación directa con la ingestión de los dinoflagelados tóxicos en cada tratamiento.

*C. gigas* está constantemente expuesto a las variaciones naturales del medio ambiente, a patógenos, toxinas y estresores que pueden ser de origen antropogénico, y debido a su naturaleza sésil, enfrenta los cambios del entorno *in situ* luchando por mantener su homeostasis para sobrevivir (Donaghy *et al.*, 2012). Los moluscos, como todos los invertebrados, disponen de un sistema de defensa que los protege contra patógenos. A diferencia de los vertebrados, el sistema inmune de los moluscos parece estar restringido a una inmunidad innata o natural, y está representado principalmente por hemocitos, proteínas plasmáticas y reacciones integradas en sistemas multiméricos que involucran ambos tipos de componentes, celular y humoral (Fisher, 1988; Sindermann, 1990; Vargas-Albores y Barraco, 2001). La fagocitosis y la producción de EROs (Especies Reactivas de Oxígeno) son los mecanismos de defensa esenciales e iniciales, para matar y limpiar de organismos invasores (Canesi *et al.*, 2002).

Vasconcelos y colaboradores (2010) señalan que las toxinas producidas por dinoflagelados afectan a la integridad de los organismos acuáticos en las primeras fases de desarrollo, ya que los invertebrados marinos no tienen sistemas enzimáticos eficaces para la desintoxicación, haciéndolos más susceptibles dadas sus altas tasas metabólicas. También se ha encontrado que los ostiones presentan una alta acumulación de tóxicos en los tejidos (toxinas o metales) principalmente después de siete días de exposición (Bricelj y Shumway, 1998; Shumway, 1991). Sin embargo, la mayoría de los moluscos bivalvos que se alimentan por filtración son relativamente insensibles a las toxinas PSP por que las STX y otras toxinas de este tipo bloquean selectivamente y con gran afinidad canales de sodio, ya que los bivalvos (en general) cuentan con nervios y músculos operados principalmente por canales de calcio activados por voltaje; esto permite a los moluscos continuar con su alimentación y acumular grandes cantidades de toxinas (Kao, 1993).

En *C. gigas* la ingestión de las células completas de *P. lima* causa una clara modulación en la síntesis de ARNm de los genes implicados en la regulación del ciclo celular y el sistema inmunológico (proteína de unión a lipopolisacárido  $\beta$ -1,3 glucano). La sobre expresión de estos genes podría estar relacionada con daño al ADN, trastornos en la continuidad del ciclo celular, probablemente un efecto genotóxico, así como una activación de su sistema inmune innato como primera línea de defensa (Romero-Geraldo *et al.*, 2014). García-Lagunas (2014) también observó una marcada modulación de los genes de respuesta inmune: cavortina (*cvt*), *lgbp*, proteína interferón 44 (*if44*) y *hsp70* en hemocitos de *C. gigas* alimentados con el dinoflagelado tóxico *G. catenatum*, lo cual indica que el dinoflagelado es reconocido como un agente extraño, que promueve la activación de una respuesta de defensa inmediata en el ostión. Audrey y colaboradores (2013) encontraron que la exposición *C. gigas* a *A. minutum* (productor de toxinas PSP) afecta directamente la transcripción de genes involucrados en el metabolismo oxidativo, metabolismo mitocondrial, reloj endógeno, así como procesos de inmunidad y detoxificación; en este caso, se observó una regulación de la transcripción en los genes estudiados en general a la baja.

Sin embargo, el efecto de las FAN's y sus ficotoxinas en la síntesis de transcritos de genes relacionados a la respuesta inmune y de defensa en bivalvos, es aún poco

conocida. Si bien la falta de estudios moleculares en años anteriores fue causada principalmente por el limitado conocimiento a nivel genético de estos organismos, en la actualidad, *C. gigas* tiene una razonable cantidad de secuencias de ADNc depositadas en GenBank lo cual permite estudiar estresores ambientales como las FAN's, a nivel de expresión genética (Mello *et al.*, 2012).

### **8.1. Análisis cuantitativo de expresión génica**

#### *8.1.1. Análisis de la expresión génica en relación a los diferentes tratamientos*

Las combinaciones de sustancias tóxicas originan efectos diferentes de los que se hubiera predicho, para las mismas sustancias de manera independiente (Capo, 2007). Se desconoce la naturaleza de muchas interacciones, tal es el caso de los efectos de la exposición de *C. gigas* a una combinación de organismos productores de toxinas marinas (PSP + DSP) formando una mezcla compleja, en la cual los compuestos tóxicos pueden interactuar generando sinergismo o por suma, generándose una potenciación, o bien de forma antagónica, la que se traduce en una disminución o cancelación total de efecto (Vásquez, 2005; Repetto, 2009; López-Cuevas, 2012).

Mediante el análisis de los resultados obtenidos, se puede observar que las tasas de expresión en los genes estudiados son directamente afectadas por la concentración de células de los dinoflagelados tóxicos, así como por el tiempo de exposición; estas observaciones coinciden con las reportadas por Romero-Geraldo (2013) y García-Lagunas (2014) en estudios previos. En la transcripción de los genes *inm*, *cp1* y *tlp* (tras los análisis por qPCR y estadísticos) se observaron tendencias con efectos similares en los tratamientos TR2 y TR3, en los cuales se suministró una proporción igual de cada especie de microalgas tóxicas (TR2, 1500:1500 cel mL<sup>-1</sup>) y una mayor proporción de *P. lima* (TR3, 3000 cel mL<sup>-1</sup>). Estos resultados sugieren un impacto negativo durante la exposición de *C. gigas* a un evento FAN de *P. lima*, el cual reconoce a esta especie como un agente potencialmente tóxico. Este dinoflagelado es conocido por producir AO, la toxina se acumula en el sistema digestivo de organismos filtradores y causa intoxicación diarreica (DSP) en humanos (Yasumoto *et al.*, 1984). El principal efecto del OA es la inhibición específica de las serin y treonin fosfatasas 1 (PP1) y 2A (PP2A) resultando en la hiperfosforilación de muchas proteínas celulares. Dado que el número

de procesos fisiológicos en los que estas fosfatasa están involucrados es inmenso, los efectos potenciales del OA son críticos para el desarrollo celular debido a que se une a la subunidad catalítica e inhibe su actividad enzimática. Las proteínas potencialmente afectadas son componentes intracelulares que señalan las vías de transducción en células eucariotas, que a su vez regulan una gran variedad de procesos implicados en el metabolismo, el equilibrio de iones, la neurotransmisión, y la regulación del ciclo celular (incluyendo la regulación del metabolismo y la expresión génica) donde la fosforilación reversible es el principal mecanismo regulador para controlar las actividades celulares (Romero-Geraldo *et al.*, 2014).

### 8.1.2. Expresión génica en cada gen

Los organismos distinguen entre lo propio y lo extraño a través de receptores de reconocimiento entre los que destacan las proteínas de unión a lipopolisacárido  $\beta$ -1,3 glucano (*lgbp*). La *lgbp* es una proteína de fase aguda que juega un papel crítico en las interacciones parásito-huésped, esta proteína activa la cascada pro-fenoloxidasa que es esencial en la respuesta general del sistema inmune innato debido a que es una respuesta general de estrés de naturaleza abiótica o biótica en invertebrados como *C. gigas* (Montagnani *et al.*, 2007; Girón-Pérez, 2010).

Los resultados de esta tesis indican una respuesta diferencial en el nivel de expresión del gen que codifica a la *lgbp* se encuentra relacionada directamente con el tiempo de exposición del dinoflagelado tóxico; se observó una sobreexpresión de *lgbp* desde las primeras horas de inicio del bioensayo (día 1) en 3 tratamientos y fue disminuyendo con el transcurso del bioensayo. Esta activación temprana de la respuesta inmune, sugiere que los ostiones son capaces de identificar a los dinoflagelados como elementos extraños o invasores, activando la respuesta inmune inmediata para proteger a los ostiones al modular inmediatamente el gen *lgbp* y no ser necesariamente una respuesta asociada al efecto provocado por la toxinas presentes en *P. lima* (AO) y *G. catenatum* (SXT). El gen *lgbp* ha sido identificado anteriormente en bibliotecas SSH de *C. gigas* expuesto a hidrocarburos donde observaron una sobreexpresión, al igual que en una exposición a parásitos protozoarios (Boutet *et al.*, 2004; Tanguy, 2004). En un estudio



realizado por Romero-Geraldo y colaboradores (2014) el gen *Cg-LGBP* se encontró sobre expresado en la exposición temprana lo que indica que se comporta como un gen constitutivo, pero es también inducible cuando las condiciones de exposición (aguda y sub-crónica) juegan un papel crítico en la interacción *C. gigas*-*P. lima*, jugando una función importante como receptor de reconocimiento de patrones.

Lo anterior corrobora la evidencia experimental presentada en este trabajo, de que la exposición de *C. gigas* a células tóxicas de *G. catenatum* y *P. lima* combinadas, incrementa temporalmente en los primeros 3 días de exposición la expresión del gen *lgbp* y podría desempeñar un papel crítico en la interacción *C. gigas*- *P.lima* / *G. catenatum* como primera línea de defensa.

La apoptosis, o muerte celular programada tipo I, juega un papel clave tanto en la respuesta inmune como durante el desarrollo. Las caspasas pertenecen a una familia de cisteín-aspartato proteasas altamente específicas y conservadas; constituyen el núcleo de la maquinaria para la apoptosis celular. Específicamente entre los 14 miembros conocidos de la familia, la caspasa 1 (*cp1*) juega un papel crítico en la ejecución del proceso de la inflamación, lo que al final conduce a apoptosis (Chen *et al.*, 2001). En un estudio realizado por L. Zhang y colaboradores (2011) el nivel de expresión en hemolinfa de cuatro genes relacionados con la apoptosis incluyendo a la caspasa 1 incremento dramáticamente en la presencia del *Vibrio anguillarum*, indicando un importante rol en la defensa antibacterial.

En este trabajo, se observó una alta modulación de la transcripción del gen *cp1* en los tratamientos TR2 y TR3 a partir del 5to día de exposición. De acuerdo con lo anterior podría implicar que los dinoflagelados (o sus toxinas) tienen algún tipo de efecto “genotóxico” en *C. gigas*, coincidiendo con las observaciones de García-Lagunas (2014) donde expuso que el incremento en la expresión de caspasa 1 indica que un daño tisular está en curso, desencadenando procesos inflamatorios en los organismos expuestos a *G. catenatum*.

La “Immunoglobulin domain cell adhesion molecule”, es una proteína pequeña (81 aa) que contiene un solo dominio similar a Ig que se encuentra normalmente en varias copias en grandes proteínas transmembrana que participan en la adhesión celular

y la comunicación de célula a célula. Es la primera identificación de una pequeña molécula en los bivalvos marinos (T. Renault et al, 2011). Esta molécula de *Crassostrea gigas* de adhesión celular con dominio de inmunoglobulina (*imm*) puede actuar como una pequeña proteína de reconocimiento a través de su único dominio similar a Ig. Puede promover la unión entre los hemocitos y cuerpos extraños que incluyen partículas de virus, y la posterior actuación de fagocitosis como opsonina en la respuesta de defensa interna del ostión. Los resultados obtenidos en el estudio de T. Renault y colaboradores (2011) sugieren que el reconocimiento del virus OsHV-1 a través de una proteína que contiene un solo dominio similar a Ig, la molécula de *Crassostrea gigas* de adhesión celular con dominio de inmunoglobulina, puede inducir la activación celular a través de una actividad opsonina. Lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el presente trabajo donde a partir del 5to día de exposición el gen *imm* se encuentra sobre-expresado más de 60 veces su nivel basal para el tratamiento TR2.

Los resultados sugieren que, aunque a las dosis ensayadas no son letales, los dinoflagelados tóxicos *P. lima* y *G. catenatum* pueden afectar de manera significativa la capacidad de respuesta del sistema inmune a través de la modificación de los niveles de transcripción de genes como *imm*, *tlp* y *lgbp*, *cp1*, *cvt* e *if44*, que se ha comprobado están relacionados con el sistema de defensa de los organismos. Sin embargo, la magnitud de los cambios y los efectos particulares pueden tener su base en la susceptibilidad de cada gen al dinoflagelado en cuestión. Esta combinación de efectos, puede promover una mayor susceptibilidad de *C. gigas* a las infecciones, sobre todo cuando se producen las FAN en combinación con otros factores de estrés, como por ejemplo durante episodios de "mortalidad de verano". Así las FAN podrían potenciar el riesgo de factores de estrés adicionales en ambientes naturales y/o acuícolas y, como consecuencia, afectar significativamente la supervivencia del ostión. A pesar de que los eventos FAN son mucho más complejos que el bioensayo aquí presentado, este estudio es uno de los primeros en tratar de analizar y comprender las respuestas a nivel molecular del ostión a través de la "simulación" de un fenómeno FAN con dos especies de los dinoflagelados tóxicos representativos de la zona noroeste de México. Se recomienda continuar con la realización de estudios genómicos y de transcriptoma para llegar más a fondo en las respuestas moleculares en moluscos bivalvos.

## 9. CONCLUSIONES

- Se encontró que el TUB, GAPDH y ACT fueron los genes más estables para utilizarlos como genes de referencia para los diferentes tratamientos y el tiempo de exposición.
- Los cambios a nivel transcripcional de los genes monitoreados fueron tiempo-tratamiento-dependientes.
- Los cambios observados en el nivel de expresión sugieren, en general, una relación directa con la ingestión de los diferentes concentraciones de dinoflagelados tóxicos en cada tratamiento:
- El incremento en la expresión de *cpl* podría indicar un proceso inflamatorio severo desencadenando daño tisular en el ostión a partir del 5to día de exposición en los tratamientos donde el dinoflagelado toxico *P. lima* tiene un papel protagónico.
- En los diferentes tratamientos, la modulación de los genes *cvt* y *lgbp* indica el reconocimiento de agentes extraños por parte del sistema inmune de *C. gigas*, lo que indica que estos genes podrían desempeñar funciones en la citoprotección y e inmunidad, principalmente durante las 24 h de exposición, confirmando su actuación como primera línea de defensa en el ostión.
- El gen *inm* codifica una proteína que participa en el sistema de reconocimiento debido a su dominio Ig, que de acuerdo a los resultados obtenidos podría desempeñar un papel importante en la activación de proteínas a mediano y largo plazo, y probablemente tenga una función de opsonina facilitando la fagocitosis de cuerpos reconocidos como extraños (en este caso dinoflagelados tóxicos) a partir del 5to día de exposición.
- Se pudo corroborar la función del producto del gen *tlp* como receptor en el sistema de reconocimiento de patrones moleculares para la detección de patógenos, e iniciación de la respuesta inflamatoria, ya que los niveles de transcritos incrementan a partir del 5to de día, lo cual concuerda con el incremento de expresión del gen *cpl*.
- Así mismo, el producto del gen *if44* podría jugar un papel importante como primera línea de defensa en *C. gigas*.

- La exposición de *C. gigas* a los dinoflagelados tóxicos de *P. lima* y *G. catenatum* provocó un aumento en el nivel de transcripción de genes que codifican proteínas implicadas en la respuesta inmune, principalmente en los tratamientos donde *P. lima* se encontraba mayormente disponible, por lo que se puede concluir que la presencia de *P. lima* genera un mayor impacto en la pérdida de la homeostasis de *C. gigas*.
- De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo la hipótesis planteada se acepta, ya que se demostró que las diferentes combinaciones de dinoflagelados tóxicos, tienen un efecto diferente en la expresión de genes de respuesta inmune, debido probablemente a las características estructurales y químicas de *G. catenatum* y *P. lima*.

## 10. LITERATURA CITADA

- Andersen C.L., Jensen J.L., Orntoft T.F. 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer research* 64:5245-5250.
- Barbosa, S. V. 2004. Detección de agentes virales en ostión japonés (*Crassostrea gigas*). Tesis de Doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. La Paz, Baja California Sur. 150 pp
- Bardovil, M., M. Bohec, M. Cormerais, S. Bougrier & P. Lassus. 1993. Experimental study of the effect of a toxic microalgal diet on feeding of the oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *J. Shellfish Res.*, 12: 417–422.
- Bauder, A.G. & Cembella A.D. 2000. Viability of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* following ingestion and gut passage in the bay scallop *Argopecten irradians*. *J. Shellfish Res.*, 19: 321–324.
- Bauder, A.G., Cembella A.D., Bricelj V.M., Quilliam M.A. 2001. Uptake and fate of diarrhetic shellfish poisoning toxins from the dinoflagellate *Prorocentrum lima* in the bay scallop *Argopecten irradians*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 213: 39–52.
- Bricelj V. M., Ford E. S., Borrero J. F., Perkins F. I., Rivara G., Hillman E. R., Elston A. R., Chang J. E. 1992. Unexplained mortalities of hatchery-reared, juvenile oysters, *Crassostrea virginica* (gmelin). *J. Shell. Res.*, 11(2): 331-347.
- Bricelj VM & Shumway SE: Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics, and bio-transformation. *Rev Fish Sci* 1998, 6:315-383.
- Boutet, I., Tanguy A., Moraga D. 2004. Characterization and expression of four mRNA sequences encoding glutathione S-transferases pi, mu, omega and sigma classes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to hydrocarbons and pesticides. *Mar. Biol.*, 146: 53–64.

- Bustin, S.A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR) trends and problems. *J Mol Endocrinol*, 29:23-39.
- Bustin, S.A. 2010. Why the need for qPCR publication guidelines? -The case for MIQE. *Method*, 50:217-26.
- Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M., Pruzzo, C., 2002. Bacteria–hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microscopy Research and Technique* 57 (6) 469–476.
- Campa-Córdova, A.I, E.J. Núñez-Vázquez., A. Luna-González, M.J. Romero-Geraldo & F. Ascencio. 2009. Superoxide dismutase activity in juvenile *Litopenaeus vannamei* and *Nodipecten subnodosus* exposed to the toxin dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Comp. Biochem. Phys. Part C*, 149: 317– 322. Capo, 2007
- Castillo-Durán A., Chávez-Villalba J., Arreola-Lizárraga A. y Barraza-Guardado R. 2010. Comparative growth, condition, and survival of juvenile *Crassostrea gigas* and *C. corteziensis* oysters cultivated in summer and winter. *Ciencias Marinas* [en línea], vol. 36 [citado 2013-04-06].
- Chomczynski, P., N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*, 162 (1), 156-159.
- <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=48013190004>. ISSN01853880.
- Clément y Lembeye, 1994. Floraciones Algales en Chile: Manejo y perspectivas futuras. En IOC Workshop.
- Cognie B., Haure J., Barrillé L. 2006. Spatial distribution in a temperatura coastal ecosystem of the wild stock of the farmed oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1873). *Aquaculture*, 259:249-259.
- Dheilly N. M., Lelong C., Huvet A., Fevrel P. 2011. Development of a Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) 31,918-feature microarray: identification of reference genes and tissue enriched expression patterns. *BMC Genomics*, 12:468.

De las Heras S., Rodriguez-Jaramillo C., Sierra-Belran A. 2009. Effects of toxic dinoflagellates genus *Prorocentrum* on Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *World Aquaculture Proceedings*. Veracruz, México.

De las Heras, S. 2009. *Efecto de dinoflagelados tóxicos del genero Prorocentrum (Dinophyceae) en el ostión japonés Crassostrea gigas (Thunberg, 1793)*. Tesis de licenciatura. UABCS, La Paz, 75 p.

European Food Safety Authority, 2008. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish - okadaic acid and analoges, *The EFSA Journal*, 589: 1-62.

Espinosa E.P., Barillé L., Allam B. 2007. Use of encapsulated live microalgae to investigate pre-ingestive selection in the oyster *Crassostrea gigas*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 343:118-126

Estrada N., 2005. Efecto de las toxinas paralíticas (PSP) del dinoflagelado *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) en el sistema de defensa de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* (Mollusca: Pectinidae). Tesis de Maestría

FAO, 2008-2013. Cultured Aquatic Species Information Programme *Crassostrea gigas*. Programa de información de especies acuáticas. **Texto de Helm, M.M.** En: *Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO* [en línea]. Roma. Actualizado 13 April 2005. [Citado 2 April 2013].

[http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea\\_gigas/es](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/es)

FAO. 2005. Biotoxinas Marinas. Estudio FAO: Alimentación y nutrición. Roma, Italia.  
[http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea\\_gigas/es](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/es)

FAO. 2006. Cultured Aquatic Species Information Programme *Crassostrea gigas*. Text by Helm, M. M. FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome.

(<http://www.cenapred.unam.mx/es/Investigacion/RQuimicos/MareaRoja>)

- García-Lagunas N. 2014. Toxicogenómica del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), expuesto a *Gymnodinium catenatum* (Graham, 1943) productor de toxinas paralizantes (PSP). Tesis doctoral en preparación. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., La Paz, Baja California Sur.
- García-Lagunas N, Romero-Geraldo R, Hernández-Saavedra NY (2013) Genomics Study of the Exposure Effect of *Gymnodinium catenatum*, a Paralyzing Toxin Producer, on *Crassostrea gigas* Defense System and Detoxification Genes. PLoS ONE 8(9): e72323. doi: 10.1371/journal.pone.0072323
- GEOHAB, 2003. Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms, Implementation Plan. P. Gentien, G. Pitcher, A. Cembella, P. Glibert (Eds.). SCOR and IOC, Baltimore and Paris. 36 pp.
- GEOHAB, 2001. Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms, Science Plan. P. Glibert, G. Pitcher (Eds.). SCOR and UNESCO.
- Glibert PM, Wazniak CE, Hall M, Sturgis B: Seasonal and interannual trends in nitrogen and brown tide in Maryland's Coastal Bays. Ecol Appl 2007, 17:79– 87.
- Girón-Pérez MI. 2010. Relationships between innate immunity in bivalve mollusks and environmental pollution. ISJ 7: 149–156.
- Hall, S., Strichartz, G., Moczydlowski, E., Ravindran, A., Reichardt, P.B. 1990. The saxitoxins, sources, chemistry and pharmacology In Marine toxins: origin, structure and molecular pharmacology. Hall, S., Strichartz, G., Eds.; American Chemical Society, Washington, D.C. 29-59
- Hallegraeff G.M., 1995. Harmful algal blooms: a global overview, In: Manual of Harmful Marine Microalgae. IOC Manuals and Guides, No. 33, UNESCO, pp. 1-22.
- Helm M.M., Bourne N. y Lovatelli, A. 2006. Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. FAO Documento Técnico de Pesca. No. 471. Roma, FAO. 182 pp.
- Hégaret, H., da Silva, P.M., Wikfors, G.H., Haberkorn, H., Shumway, S.E., Soudant, P., 2011. In vitro interactions between several species of harmful algae and haemocytes of



- bivalve molluscs. *Cell Biology and Toxicology* 27 (4) 249–266.
- Hégaret, H., Wikfors G., Soudant P., Lambert C.E.S., Bérard J. B., 2007. Minimal apparent effect on oyster hemocytes, *Aquat. Living Resour.* 152:441-447.
- Hégaret H., Brokordt K.B., Gaymer C.F., Lohrmann K.B., García C., Varela D. 2012. Effects of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* on histopathological and escape responses of the Northern scallop *Argopecten purpuratus*. *Harmful Algae* 18, 74–83.
- Heredia-Tapia, A., B.O. Arredondo-Vega, E.J. Núñez-Vázquez, T. Yasumoto, M. Yasuda & J.L. Ochoa. 2002. Isolation of *Prorocentrum lima* (Syn. *Exuviaella lima*) and diarrhetic shellfish poisoning (DSP) risk assessment in the Gulf of California, México. *Toxicon*, 40: 1121–1127.
- Herrera-Sepúlveda A., Sierra-Beltrán A., Hernández-Saavedra N. 2008. Floraciones Algales Nocivas: perspectivas y estrategias biotecnológicas para su detección. *BioTecnología*, 12(1): 23-40.
- Hu, T., Curtis, J.M., Walter, J.A., Wright, J.L.C., 1995. Identification of DTX4, a new water-soluble phosphatase inhibitor from the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *J. Chem. Soc. Chem Commun*, 597-599
- Huggett, J., K. Dheda, S.A. Bustin, A. Zumla. 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity*. 6:279-284.
- Kao, C.Y., Levinson, S.R., Eds. 1986; Tetrodotoxin, saxitoxin and the molecular biology of the sodium channel. *Annals of the New York Academy of Sciences*, New York. Vol. 479, 448 pp.
- Lacoste, A., S.K. Malham, F. Gelebart, A. Cuffe & S.A. Poulet. 2002. Stress-induced immune changes in the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.*, 26: 1–9.
- Landsberg, 2002. The effects of harmful algal blooms on aquatic organism. Pp 146-15. En: Stickney, R (Ed). *Reviews in Fisheries Science*, 10 (2): 113-390 CRC Press.
- Legrand, A.M., Benoit, E., Molgo, J., 2001. Toxicology of phycotoxins targeting sodium

- channels. In *Mycotoxins and Phycotoxins in perspective at the turn of the milenium*. Koe, W.J., Samson, R.A., van Egmond, H.P., Gilbert, J., Sabino, M., Eds.; Ponsen & Looyen, Wageningen, 455-462.
- Lindahl O., 1998. Occurrence and monitoring of harmful algae in the marine environment. In: *Micotoxins and phycotoxins development in chemistry, toxicology and food safety*. Miraglia M., Van Egmond H., Brera C. & Gilberst J.(eds). *Proceedings of the IX International IUPAC Symposium of Micotoxins and Phycotoxins*.pp. 409-423.
- Livak, K.J. y T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25 (4): 402–408.
- Llera-Herrera R. A. 2008. Expresión molecular de vitelogeninas en el ostión japonés *Crassostrea gigas*. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. La Paz, Baja California Sur. pp. 1-7
- López-Cuevas A. 2013. Efecto de la exposición de juveniles del ostión japonés *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) a dinoflagelados tóxicos productores de toxinas DSP y PSP. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., La Paz, Baja California Sur.
- Maeda-Martínez, A.N. 2008. Estado actual del cultivo de bivalvos en México. En A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO . Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO. pp. 91–100
- Malham S. K., Cotter E., O’Keeffe S., Lynch S., Sarah C., Beaumont A. R. 2009. Summer mortality of the pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Irish Sea: the influence of temperature and nutrients on health and survival. *Aquaculture*, 287: 128-138.
- Manduzio, H., B. Rocher, F. Durand, C. Galap & F. Leboulenger. 2005. The point about oxidative stress in mollusks. *Invertebr. Survival J.*, 2: 91–104.

- Mat A.M., Haberkorn H., Bourdineaud J-P., Massabuau J-C. and Tran D. 2013. Genetic and genotoxic impacts in the oyster *Crassostrea gigas* exposed to the harmful alga *Alexandrium minutum*. *Aquatic Toxicology* 140– 141 (2013) 458– 465
- Mathews V.H. 2003. *Bioquímica*. Editorial Addison Wesley. 593-595pp.
- Martin-López, Gallardo, Sánchez, García, Molina. 2011. Immunoregulatory potencial of marine algal toxics yessotoxin and okadaic acid in mouse T lymphocyte cell line EL-4. *Toxicology Letters*, 207: 167-172
- Matus, M. 2013. Expresión diferencial de proteínas en juveniles de ostión japonés *Crassostrea gigas* expuestos a organismos del género *Prorocentrum* spp. Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. México.p106.
- Montagnani C, Avarre JC, de Lorgeril J, Quiquand M, Boulo V, et al. 2007. First evidence of the activation of Cg-timp, an immune response component of Pacific oysters, through a damage-associated molecular pattern pathway. *Dev Comp Immunol* 31: 1–11.
- Mons M. N., Van Egmond H. P., Speijers G.J.A. 1998. Paralytic shellfish poisoning: A review. RIVM Report 388802 005.
- Mello. D.F., E.S. Oliveira, R.C. Vieira, E. Simoes, R. Trevisan, A.L. Dafre, M.A. Barracco. 2012. Cellular and transcriptional responses of *Crassostrea gigas* hemocytes exposed in Vitro to brevetoxin (PbTx-2). *Mar Drugs*. 10:583-597.
- Negri, A., Stirling, D., Quilliam, M., Blackburn, S., Bolch, C., Burton, I., Eaglesham, G., Thomas, K., Walter, J., Willis, R., 2003. Three novel hydroxybenzoate saxitoxin analogues isolated from the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Chem. Res. Toxicol.* 16, 1029–1033
- Renault T., N. Faury, V. Barbosa-Solomieu, K. Moreau, 2011. Suppression subtractive hybridisation (SSH) and real time PCR reveal differential gene expression in the Pacific cupped oyster, *Crassostrea gigas*, challenged with Ostreid herpesvirus. *Developmental & Comparative Immunology* 35 (7): 725-735.
- Repetto M. G. 2009. *Toxicología Fundamental*. 2a Edición, Ed. Doyma, México, 672 p.

- Romero-Geraldo R., 2013. Identificación molecular y estudio de la expresión diferencial de genes en el ostión del pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), como respuesta a la exposición a un dinoflagelado productor de toxinas marinas de tipo diarreico. Tesis doctoral en preparación. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., La Paz, Baja California Sur.
- Romero-Geraldo R. J. and Hernández-Saavedra N. Y. 2012. Stress gene Expression in *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) in response to experimental exposure to the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge, 1975. *Aquaculture Research*, doi:10.1111/are.12100.
- de Jesús Romero-Geraldo R, García-Lagunas N, Hernández-Saavedra NY., 2014. Effects of In Vitro Exposure to Diarrheic Toxin Producer *Prorocentrum lima* on Gene Expressions Related to Cell Cycle Regulation and Immune Response in *Crassostrea gigas*. *PLoS ONE* 9(5): e97181. doi: 10.1371/journal.pone.0097181
- Ruppert E. y Barnes D. 1995. Zoología de los Invertebrados. Sexta Edición. Editorial MacGraw-Gill Interamericana. México.
- Saavedra, C. & E. Bachère. 2006. Bivalve genomics. *Aquaculture*, 256: 1–14.
- Smayda, T.J. 2002. Adaptive ecology, growth strategies and the global bloom expansion of dinoflagellates. *J. Oceanography*, 58: 281–294.
- Shantz E. J. 2006. Chemistry and biology of saxitoxin and related toxins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 479: 15-23.
- Schmitt, R. D. Rosa, M. Dupertuy, J. de Lorgeril, E. Bachère y D. Destoumieux-Garzón. 2012. The antimicrobial defense of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. How diversity may compensate for scarcity in the regulation of resident/pathogenic microflora. doi: 10.3389/fmicb.2012.00160
- Schmitz, FJ., Prasard, RS., Gopichand, Y., Houssain, MB., van der Helm, D., Schmidt, P., 1981. Acanthifolicin, a new episulfide-containing polyether carboxylic acid from extracts of the marine sponge *Pandaros acanthifolium*. *J. Am. Chem. Soc.* 103: 2467-2469.

- Shumway S.E. 1990. A review of the effects of algal blooms on Shellfish and aquaculture. *J World Aquaculture Society*, 21:65-104.
- Shumway, S.E. 1991. Scallops: biology, ecology and aquaculture. *Elsevier Science Publishers* B.V. New York, USA. 1095 pp.
- Stoecker, D., J. Adolf, A. Place, P. Glibert, D. Meritt. 2008. Effects of the dinoflagellates *Karlodinium veneficum* and *Prorocentrum minimum* on early life history stages of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Marine Biology*. 154:81–90.
- Sierra-Beltrán, A.P., A. Cruz-Villacorta, E. Núñez-Vázquez, L.M. Del Villar, J. Cerecero, J.L. Ochoa. 1998. An overview of the marine food poisoning in México. *Toxicon*. 35:447-453.
- Ochoa, J.L., A. Sánchez-Paz, A. Cruz-Villacorta, E. Nuñez-Vázquez, A. Sierra-Beltrán. 1997. Toxic events in the northwest Pacific coastline of México during 1992-1995: origin and impact. *Hidrobiología*. 352:195–200.
- Pearse I, Handlingner JH, Hallegraeff G.M. 2005. *Harmfull Algae*, 4:61-74.
- Pfaffl, M.W., A. Tichopad, C. Prgomet, T.P. Neuvians, 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology letters* 26:509-515.
- Premazzi, G. and Volterra, L., 1993. *Microphyte toxins. A manual for toxin detection, environmental monitoring and therapies to counteract intoxications*. Joint Research Center. Commission of the European Communities. Brussels, 338 pp.
- Pipe, R.K. & J.A. Coles. 1995. Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. *Fish & Shellfish Immun.*, 5: 581–595.
- Tachibana, K., Scheuer, P.J., Tsukitani, Y., Kikuchi, H., Engen, D.V., Clardy, J., Gopichand, Y., Schmitz, F.J., 1981. Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *Halichondria*. *J. Am. Chem. Soc.* 103: 2469-2471

- Tanguy, A., I. Boutet, J. Laroche & D. Moraga. 2005. Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to pesticide exposure. *FEBS J.*, 272: 390–403.
- Tiscar, P.G. & F. Mosca. 2004. Defense mechanisms in farmed marine molluscs. *Vet. Res. Commun.*, 28: 57–62.
- Tran D., H. Haberkorn, P. Soudant, P. Ciret & J.C. Massabuau. 2010. Behavioral responses of *Crassostrea gigas* exposed to the harmful algae *Alexandrium minutum*. *Aquaculture*, 298(3-4): 338–345.
- Vale, C., L. Botana. 2008. Marine toxins and the cytoskeleton: okadaic acid and dinophysistoxins. *FEBS Journal*. 275:6060-6066.
- Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, F. Speleman. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*. 3(7):1-34.
- Vargas-Albores, F. y M.A. Barracco. 2001. Mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos, con énfasis en pectínidos. En: Los moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura (Maeda-Martínez, A. N., ed.) pp. 127-146. Editorial Limusa, México, D. F.
- Vasconcelos, V., J. Azevedo, M. Silva, V. Ramos. 2010. Effects of marine toxins on the reproduction and early stages development of aquatic organisms. *Marine Drugs*. 8: 59-79.
- Vásquez-Botello A. 2005. Curso Básico de Toxicología Ambiental. 3a Edición, Editorial Limusa, México, 695 P.
- Wikfors, G.H. 2005. A review and new analysis of trophic interactions between *Prorocentrum minimum* and clams, scallops and oysters. *Harmful Algae*, 4: 585–592.
- Wikfors, G.H., R.M. Smolowitz. 1995. Experimental and histological studies of four lifehistory stages of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, exposed to a cultured strain of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Biol Bull*. 188:313–328.

Yasumoto, T., M. Murata, Y. Oshima, G.K. Matsumoto, J. Clardy.1984. Diarrhetic shellfish poisoning. In: American Chemical Society, Ragelis EP, Ed.; Washington, USA, 207–214.

Yasumoto T., Murata M. 1993. Marine toxins. Chem. Rev. 93, 1897–1909.

## 11. ANEXOS

**Tabla VII.** Desviación estándar por tratamiento de los genes blanco.

Gen	Tratamiento	Desviación estándar entre replicas			
		Día 1	Día 3	Día 5	Día 7
<i>cvt</i>	Control (C1)	0	0	0	0
	TR1	0.63	0.36	0.56	0.068
	TR2	0.63	1.29	0.07	0.024
	TR3	0.66	0.22	0.48	0.011
<i>lgbp</i>	Control (C1)	0	0	0	0
	TR1	0.50	0.64	0.74	0.66
	TR2	0.67	0.78	0.23	0.04
	TR3	0.66	0.10	0.66	0.04
<i>if44</i>	Control (C1)	0	0	0	0
	TR1	0.49	0.16	0.98	2.41
	TR2	1.50	3.81	8.04	4.23
	TR3	3.72	1.73	0.01	1.67
<i>inm</i>	Control (C1)	0	0	0	0
	TR1	0.46	2.75	3.48	2.90
	TR2	0.12	---	2.35	33.71
	TR3	0.44	---	1.14	2.92
<i>cp1</i>	Control (C1)	0	0	0	0
	TR1	1.70	0.27	4.15	3.40
	TR2	0.16	3.51	3.38	26.57
	TR3	0.66	2.17	1.12	7.43
<i>tlp</i>	Control (C1)	0	0	0	0
	TR1	0.09	0.39	0.39	2.31
	TR2	0.16	0.10	2.81	10.38
	TR3	0.10	3.08	0.22	3.06