



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

**Expresión diferencial de proteínas en juveniles de  
ostión japonés *Crassostrea gigas* expuestos a  
organismos del género *Prorocentrum* spp.**

**TESIS**

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

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

Presenta

**Miguel Ángel Matus Hernández**

La Paz, Baja California Sur, Marzo de 2013

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12:00 horas del día 26 del Mes de Febrero del 2013, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"Expresión diferencial de proteínas en juveniles de ostión japonés *Crassostrea gigas* expuestos a organismos del género *Prorocentrum spp.*"**

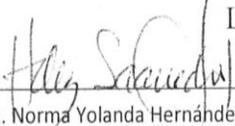
Presentada por el alumno:

**Miguel Ángel Matus Hernández**

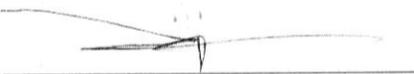
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN: **Biotecnología.**

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

LA COMISIÓN REVISORA

  
Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra  
DIRECTOR DE TESIS

  
Dra. Thelma Castellanos Cervantes  
CO-TUTOR

  
Dr. Arturo Sánchez Paz  
CO-TUTOR

  
DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

### **Conformación de Comités**

La presente tesis fue dirigida por

Dra. Norma Y. Hernández Saavedra CIBNOR

### **Comité tutorial**

Dra. Norma Y. Hernández Saavedra CIBNOR

Dra. Thelma R. Castellanos Cervantes CIBNOR

Dr. Arturo Sánchez Paz CIBNOR

### **Comité revisor**

Dra. Norma Y. Hernández Saavedra CIBNOR

Dra. Thelma R. Castellanos Cervantes CIBNOR

Dr. Arturo Sánchez Paz CIBNOR

### **Miembros del jurado del examen de tesis**

Dra. Norma Y. Hernández Saavedra CIBNOR

Dra. Thelma R. Castellanos Cervantes CIBNOR

Dr. Arturo Sánchez Paz CIBNOR

Dr. Ricardo Vázquez Juárez CIBNOR

(Suplente)

## Resumen

Las especies del género *Prorocentrum* se encuentran ampliamente distribuidas a lo largo del Pacífico y el Golfo de California, existiendo una alta probabilidad de que sean ingeridas por diversas especies filtradoras, dentro de las que se encuentra el ostión japonés *Crassostrea gigas*, afectando su crecimiento, supervivencia y reproducción. Por lo tanto, en este estudio se pretende caracterizar la respuesta fisiológica de *C. gigas* ante este estresor, mediante la identificación y evaluación de los cambios en los patrones de expresión de proteínas mediante electroforesis bidimensional (2-DE). Juveniles de ostión japonés *C. gigas* (5-7 mm) fueron expuestos a células completas (1200, 2400, 3600, 4800 y 6000 cel mL<sup>-1</sup>) de *Prorocentrum lima*, *Prorocentrum minimum* y *Prorocentrum rhathymum*, e independientemente a diversas diluciones de extractos acuosos y orgánicos obtenidos de las mismas especies (1:50, 1:100 y 1:200). Mediante un análisis comparativo de los mapas proteómicos generados a partir 2-DE, se detectaron cambios en la expresión de algunas proteínas, obteniéndose un patrón electroforético con 434 proteínas en homogenados de organismos expuestos a células completas, de los cuales 26 presentaron diferencias significativas en la expresión. En los homogenados de organismos expuestos a extractos acuosos se detectaron un total de 476 proteínas, observándose diferencias significativas en siete, y finalmente, en los extractos de organismos expuestos a extractos orgánicos se detectaron 623 proteínas, encontrándose diferencias significativas en 13. Para el análisis de espectrometría de masas se seleccionaron los puntos de proteína que presentaron una expresión diferencial con respecto al control, encontrándose que cada uno de los puntos peptídicos correspondió a diferentes proteínas. En los organismos expuestos a 6,000 cel mL<sup>-1</sup> se seleccionaron cuatro puntos de proteínas, de los cuales 3 presentaron una disminución en la expresión y 1 sobre expresión con cada una de las cepas; identificándose un total de siete proteínas: *Proteína Toll de interacción*; *Dihidropteridina reductasa*, *Proteína secretora rica en cisteína LCCL dominio 2*, *Periostina*, *Catepsina L*, *Tropomiosina* y *cadena ligera esencial de miosina*; en los extractos acuosos se seleccionó un punto de proteína sobre-expresado con *P. lima*, y disminuida su expresión con *P. minimum* y *P. rhathymum* identificándose 4 posibles proteínas: *Actina citoplasmática*, *Cavotrina*, *Proteína disulfuro isomerasa* e *Hidroxiantranilato dioxigenasa*; finalmente con el extracto orgánico fueron dos puntos de proteína sobre expresados con cada una de las cepas, identificándose cinco proteínas (*Troponina C*, *Proteína 1 relacionada con la ependimina de mamíferos*, *Proteína citoplasmática no neuronal de filamentos intermedios*, *Isoforma 2 de la proteína-quinasa dependiente de calcio* y *Helicasa del ARN-spliceosoma*). Las principales funciones biológicas afectadas de las proteínas por la exposición de juveniles de *C. gigas* a células completas de *P. lima*, *P. minimum* y *P. rhathymum*, así como también a cada uno de sus extractos son: actividades del citoesqueleto, estrés oxidativo, las propiedades de la concha, del sistema inmune, metabolismo, respuesta a estrés y síntesis de proteínas.

**Palabras clave.** *C. gigas*, *Prorocentrum*, proteínas, electroforesis bidimensional (2-DE)

## Abstract

Species of the genus *Prorocentrum* are found widely distributed along the Pacific and the Gulf of California with a high probability of being ingested by various filtering species affecting their growth, survival and reproduction. One of these species is the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. Therefore, this study intends to characterize *C. gigas* physiological response to this stressor by identifying and assessing changes in protein expression patterns by bidimensional electrophoresis (2-DE). Juvenile Japanese oysters *C. gigas* (5-7 mm) were exposed to whole cells (1200, 2400, 3600, 4800, and 6000 cells mL<sup>-1</sup>) of *Prorocentrum lima*, *Prorocentrum minimum*, and *Prorocentrum rhathymum*, and independently at various dilutions of aqueous and organic extracts obtained from the same species (1:50, 1:100 and 1:200). Through a comparative analysis of proteomic maps generated from 2-DE, changes were detected in some protein expressions; we obtained an electrophoretic pattern with 434 spots in the organism homogenates exposed to whole cells, of which 26 showed significant expression differences. In the homogenates exposed to aqueous extracts a total of 476 spots were detected; significant differences were observed in seven of them; finally, 623 spots were detected in the extracts of those exposed to organic extracts, finding significant differences in 13 of them. For the mass spectrometric analysis we selected the protein spots that showed a differential expression with respect to control. The results showed that each one of the peptide points corresponded to different proteins. Four protein spots were selected from the organisms exposed to 6.000 cells mL<sup>-1</sup>, of which three showed a down-regulated and one up-regulated expressions with each one of the strains. We identified a total of seven proteins: *Toll-interacting protein*, *Dihydropteridine reductase*, *Cysteine-rich secretory protein LCCL domain-containing 2*, *Periostin*, *Tropomyosin*, and *myosin essential light chain*. From the aqueous extracts, we selected one up-regulated protein spot with *P. lima* and one down-regulated with *P. minimum* and *P. rhathymum*, identifying four possible proteins *Actin cytoplasmic*, *Cavortin*, *Protein disulfide-isomerase A6* and *hydroxyanthranilate dioxygenase*; finally, with the organic extract two protein spots were up-regulated with each one of the strains, identifying five proteins (*Troponin C*, *Mammalian ependymin-related protein 1*, *Non-neuronal cytoplasmic intermediate filament protein*, *Calcium-dependent protein kinase isoform 2*, and *Spliceosome RNA helicase*). The main biological functions affected from the protein by exposure of *C. gigas* juveniles to whole cells of *P. lima*, *P. minimum* and *P. rhathymum*, as well as to each one of their extracts are: cytoskeletal activity, oxidative stress, shell properties, immune system, metabolism, stress response, and protein synthesis.

**Keywords.** *C. gigas*, *Prorocentrum*, proteins, bidimensional electrophoresis (2-DE)

## **Dedicatoria**

*A mi familia, padres y hermanos por el gran cariño y apoyo incondicional  
que me han brindado en todo momento....*

## **AGRADECIMIENTOS**

*Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR) por permitirme realizar mis estudios de posgrado y por el uso de sus instalaciones para la realización de este trabajo.*

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca (243644) otorgada.*

*A la Dra. Norma Y. Hernández-Saavedra por depositar su confianza y creer en mi para realizar este trabajo, así como también por su apoyo y críticas siempre constructivas, estaré siempre agradecido.*

*A mi comité revisor Dra Thelma R. Castellanos Cervantes y Dr. Arturo Sánchez Paz por sus atinados comentarios, sugerencias y por las observaciones emitidas en la redacción de la tesis.*

*A Delia Rojas Posadas por ser parte fundamental en la realización de este trabajo, por sus consejos, orientación, y sobre todo por la paciencia y amistad brindada.*

*A Arturo Sierra, por todo el apoyo brindado.*

*A la M.C. Diana Leticia Dorantes Salas por su ayuda en la edición del abstract*

*A mis compañeros de maestría con los que conviví y compartí momentos maravillosos!!  
Rubén C., Tonatihu, Tico, Milton, Eli, Dome, Arturo, Ruben A. Cinthia, Viri y Abel.*

*De manera especial a Rosa M. Velasquez Ruiz por todo el cariño, confianza y apoyo otorgado a pesar de la distancia.*

## ÍNDICE

Contenido	páginas
1. Introducción .....	1
1.1. Características generales del ostión japonés <i>C. gigas</i> .....	3
1.2. Dinoflagelados .....	6
1.3. Florecimientos algales nocivos (FANs) .....	7
1.4. Características generales del género <i>Prorocentrum</i> .....	9
1.5. Aplicaciones de la proteómica en ecotoxicología de bivalvos .....	12
2. Antecedentes .....	14
3. Justificación .....	15
4. Hipótesis .....	16
5. Objetivos .....	16
5.1. Objetivo general .....	16
5.2. Objetivos particulares .....	16
6. Materiales y métodos .....	17
6.1. Organismos .....	17
6.2. Obtención de extractos .....	17
6.3. Diseño experimental .....	18
6.4. Extracción de proteínas totales .....	18
6.5. Electroforesis 2-D .....	19
6.5.1. Separación en la primera dimensión: Isoelectroenfoque (IEF) .....	19
6.5.2. Segunda dimensión SDS-PAGE .....	19
6.5.3. Tinción de geles .....	20
6.5.4. Análisis de geles .....	20
6.5.5. Identificación de proteínas por espectrometría de masas .....	21

7.	Resultados .....	22
7.1.	Mortalidad .....	22
7.2.	Electroforesis bidimensional .....	25
7.2.1.	Análisis 2D de extractos proteicos de ostiones expuestos a células completas de tres especies de dinoflagelados .....	26
7.2.1.1.	Expresión diferencial de proteínas de juveniles de ostión <i>Crassostrea gigas</i> expuestos a células completas de dinoflagelados .....	27
7.2.2.	Análisis 2D de proteínas obtenidas de organismos expuestos a extractos acuosos de tres especies de dinoflagelados .....	29
7.2.2.1.	Expresión diferencial de proteínas de juveniles de ostión <i>Crassostrea gigas</i> expuestos a extractos acuosos.....	29
7.2.3.	Análisis 2D de proteínas obtenidas de ostiones expuestos a extractos orgánicos de tres especies de dinoflagelados. ....	31
7.2.3.1.	Expresión diferencial de proteínas de juveniles de ostión <i>Crassostrea gigas</i> expuestos a extractos orgánicos.....	31
7.3.	Proteínas seleccionadas para su identificación mediante el análisis de espectrometría de masas .....	33
7.4.	Identificación de proteínas. ....	37
7.4.1.	Proteínas obtenidas bajo exposición a células completas .....	37
7.4.2.	Proteínas obtenidas bajo exposición a extractos acuosos.....	41
7.4.3.	Proteínas identificadas bajo exposición a extractos orgánicos.....	43
7.4.4.	Proteína constitutiva.....	46
8.	Discusiones .....	46
8.1.	Efecto de <i>P. lima</i> , <i>P. minimum</i> y <i>P. rhathymum</i> en juveniles de <i>C. gigas</i> .....	46
8.2.	Análisis de las proteínas.....	50
8.2.1.	Efecto de la exposición de juveniles de <i>C. gigas</i> a células completas de tres especies del genero <i>Prorocentrum</i> .....	50

8.2.2. Efecto de la exposición de juveniles de <i>C. gigas</i> a extractos acuosos de tres especies del genero <i>Prorocentrum</i> .....	58
8.2.3. Efecto de la exposición de juveniles de <i>C. gigas</i> a extractos orgánicos de tres especies del genero <i>Prorocentrum</i> .....	63
8.3. Electroforesis bidimensional .....	69
9. Conclusión .....	73
10. Literatura citada .....	76
11. Anexos .....	101

## ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	páginas
Figura 1. Anatomía de <i>C. gigas</i> . A, externa y B, interna.....	4
Figura 2. Características morfológicas de los dinoflagelados. ....	7
Figura 3. Distribución del género <i>Prorocentrum</i> en las costas de la República Mexicana....	9
Figura 4. Fotografía tomada mediante SEM de <i>P. lima</i> .....	10
Figura 5. Fotografía tomada mediante SEM de <i>P. minimum</i> .....	10
Figura 6. Comparación esquemática de las principales características morfológicas y de ornamentación entre <i>P. mexicanum</i> y <i>P. rhathymum</i> . ....	11
Figura 7. Mortalidad de juveniles de ostión <i>C. gigas</i> expuestos a células completas (1,200; 2,400; 3,600; 4,800 y 6,000 cel mL <sup>-1</sup> ) de <i>P. lima</i> , <i>P. minimum</i> y <i>P. rhathymum</i> . ....	23
Figura 8. Mortalidad de juveniles de <i>C. gigas</i> expuestos a diluciones de EA de <i>P. lima</i> , <i>P. minimum</i> y <i>P. rhathymum</i> . ....	24
Figura 9. Mortalidad de juveniles de <i>C. gigas</i> expuestos a diluciones de EO de <i>P. lima</i> , <i>P. minimum</i> y <i>P. rhathymum</i> . ....	25
Figura 10. Electroforesis 2D de homogenados de juveniles <i>C. gigas</i> bajo diferentes tratamientos de de-salinización.....	26
Figura 11. Patrón de proteínas solubles obtenido mediante electroforesis 2D de extractos de juveniles <i>C. gigas</i> expuestos a células completas.....	27
Figura 12. Expresión diferencial puntos de proteína estadísticamente significativos en <i>C. gigas</i> expuesto a células completas de tres especies de dinoflagelados .....	28
Figura 13. Patrón de proteínas obtenido mediante electroforesis 2D de homogenados proteicos de <i>C. gigas</i> expuestos a una dilución 1:50 de extractos acuosos de: A) agua destilada, B) <i>P. lima</i> , C) <i>P. minimum</i> y D) <i>P. rhathymum</i> . ....	29
Figura 14. Expresión diferencial de puntos de proteína de <i>C. gigas</i> expuestos a extractos acuosos .....	30
Figura 15. Mapa proteómico de extractos de juveniles de <i>C. gigas</i> expuestos a extractos orgánicos diluidos 1:50 de: A) Tween 60, B) <i>P. lima</i> , C) <i>P. minimum</i> y D) <i>P. rhathymum</i> . ....	31

Figura 16. Patrón de expresión de proteínas de <i>C. gigas</i> que presentaron expresión diferencial al ser expuestos a extractos orgánicos de las tres especies de dinoflagelados.....	32
Figura 17. Perfil de expresión 2D de proteínas obtenidas de <i>C. gigas</i> expuestos a <i>I. galbana</i> (control); .....	34
Figura 18. Mapa proteómico de extractos de juveniles de <i>C. gigas</i> expuestos a un extracto acuoso de <i>P. minimum</i> . .....	35
Figura 19. Mapa proteómico de extractos de juveniles de <i>C. gigas</i> expuestos a extractos orgánicos (control).....	36
Figura 20. Mapa proteómico de extractos de juveniles de <i>C. gigas</i> expuestos a <i>I. galbana</i> (control). .....	37

## ÍNDICE DE TABLAS

Contenido	páginas
Tabla I. Proteínas reguladas obtenidas de organismos expuestos a células completas (CC).....	33
Tabla II. Proteínas reguladas obtenidas de organismos expuestos a extractos acuosos....	34
Tabla III. Proteínas reguladas obtenidas de organismos expuestos a extractos orgánicos. .....	35
Tabla IV. Valores en % Volumen de los puntos de proteína que mantuvieron su expresión estable tanto en los organismos expuestos a las células completas, extractos acuosos y orgánicos de las especies de dinoflagelados: <i>P. lima</i> , <i>P. minimum</i> y <i>P. rhathymum</i> . ....	36
Tabla V. Lista de proteínas identificadas de los extractos de proteínas solubles obtenidas de ostiones expuestos a células completas .....	40
Tabla VI. Lista de proteínas identificadas de los extractos de proteínas solubles obtenidos de ostiones expuestos a extractos acuosos .....	42
Tabla VII. Lista de proteínas identificadas de los extractos de proteínas solubles obtenidos de ostiones expuestos a extractos orgánicos.....	45

## 1. Introducción

Los moluscos bivalvos constituyen una de las principales fuentes de alimento en todo el mundo, con una producción estimada en más de 13 millones de toneladas métricas (FAO, 2009), siendo las especies del género *Crassostrea* las de mayor importancia comercial a nivel global, por su alto potencial de desarrollo acuícola dada su amplia tolerancia a condiciones estuarinas y rápido crecimiento (Cásares-Martínez *et al.*, 2004). El ostión del Pacífico, *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793) se distribuye de forma natural en las costas de Japón, China y Corea, sin embargo, actualmente es la especie marina más cultivada en el mundo con una producción de 4.6 millones de toneladas métricas en el 2008 (FAO, 2009). Así también, entre los lofotrocozoos esta especie ha sido frecuentemente considerada uno de los mejores modelos biológicos caracterizados por estudios bioquímicos, moleculares y genéticos (Saavedra y Bacheree, 2006; Dheilily *et al.*, 2011).

*C. gigas* se ha cultivado en Japón desde hace varios siglos, y su cultivo se ha introducido en muchos países (Leffler y Greer, 1991). En México, la acuicultura de ostiones se ha centrado principalmente en dos especies: *Crassostrea virginica* en el Golfo de México y *C. gigas* en las costas del norte del Océano Pacífico (Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2008). El cultivo de *C. gigas* se ha consolidando desde su introducción en 1973 (Cáceres-Martínez *et al.*, 2004), sin embargo, al igual que en otras partes del mundo se han presentado diversos problemas relacionados con su mortalidad, siendo más evidentes desde 1997, cuando se han registrado mortalidades masivas de semillas, juveniles y adultos (Chávez-Villalba *et al.*, 2007), observándose en los últimos años un incremento en las tasas de mortalidad de ostión, principalmente durante los meses de verano, afectando juveniles y adultos de variantes tanto diploides como triploides.

Los eventos de mortandad se han reportado en diversos países, llegando a considerarse un problema mundial ya que limita severamente la producción de ostión. Particularmente, este problema ha sido evidente para *C. gigas* desde principios de 1980, sin que hasta la fecha se conozca con certeza la causa (Cheney *et al.*, 2000; Cáceres-Martínez *et al.*, 2004; Dégrement *et al.*, 2005; Chávez-Villalba *et al.*, 2008), aunque se ha sugerido que factores como interacciones complejas con el ambiente, y diversos tipos de patógenos pudieran estar

asociados a estos eventos, especialmente en etapas críticas, como aquellas vinculadas a procesos de reproducción (final de la madurez, desoves y reabsorción de gametos) (Gouletquer *et al.*, 1998).

Los ostiones son organismos sésiles-filtradores, por lo que se encuentran continuamente expuestos a modificaciones fisicoquímicas en el agua en que habitan, y por lo tanto, se alimentan de partículas en suspensión, como materia orgánica, bacterias y, principalmente, microalgas (Helm y Bourne, 2004). Las microalgas son un grupo de organismos formado, a su vez, por diversos sub-grupos entre los que destacan las diatomeas y los dinoflagelados, que bajo determinadas condiciones oceanográficas pueden llegar a presentar incrementos poblacionales explosivos, que son generalmente caracterizados por la producción de toxinas, que pueden ser nocivas para una gran variedad de organismos, incluidos los ostiones. Las especies de dinoflagelados tóxicos se encuentran ampliamente distribuidas en todos los mares, siendo los tropicales donde existe un mayor número de especies. *Prorocentrum* es uno de los géneros más importantes entre los dinoflagelados tóxicos debido a que se han reportado un gran número y abundancia de especies productoras de toxinas (Delgado *et al.*, 2002).

Debido a que se ha asociado la ocurrencia simultánea de mortalidad de moluscos con la proliferación repentina de algunas especies del género *Prorocentrum* en costas mexicanas (Ochoa *et al.*, 2002; Cortés -Altamirano y Sierra-Beltrán, 2003; Sierra-Beltrán *et al.*, 2005), se han realizado varios estudios sobre esta microalga. Para dinoflagelados del género *Prorocentrum* existen reportes sobre su taxonomía (Becerril, 2000; Cortés-Altamirano y Sierra-Beltrán, 2003; Sierra-Beltrán *et al.*, 2005), monitoreo de proliferaciones (Hernández-Becerril *et al.*, 2000; Delgado *et al.*, 2002; Gayoso *et al.*, 2002; Cortés-Altamirano *et al.*, 2004; Licea *et al.*, 2004; Gárate-Lizárraga y Muñetón-Gómez, 2008) y producción de toxinas (Carmody *et al.*, 1995; Plumley, 1997; Draisci *et al.*, 1998).

Aunque desde 1993 se han realizado estudios sobre el efecto de dinoflagelados en algunos moluscos bivalvos (Wikfors y Smolowitz, 1993, 1995; Svensson y Förlin, 1998; Díaz *et al.*, 2007), en ellos sólo se han considerado variables fisiológicas como sobrevivencia, tasa de aclaramiento, tasa de depuración, crecimiento y acumulación de toxinas. Sólo en años

recientes se ha planteado el uso de la proteómica para estudios ecotoxicológicos, básicamente para la detección de cambios en la expresión de proteínas a causa de contaminantes (Bradley *et al.*, 2002; Hogstrand *et al.*, 2002; Rodríguez-Ortega *et al.*, 2003; Shrader *et al.*, 2003; Knigge *et al.*, 2004; Manduzio *et al.*, 2005; Mi *et al.*, 2005; Bjørnstad *et al.*, 2006; Gomiero *et al.*, 2006; Apraiz *et al.*, 2006).

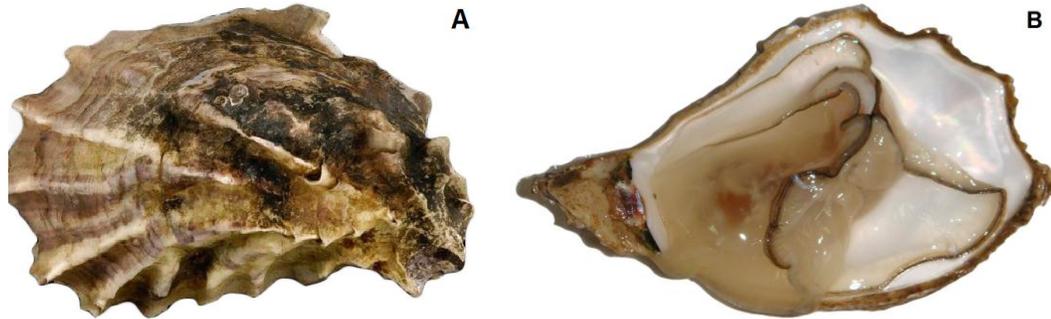
Los perfiles proteómicos son generalmente modificados por el estrés y, por lo tanto, deben ser distintivos de ciertos tipos de exposición a tóxicos (Hogstrand *et al.*, 2002). El análisis 2-DE es la herramienta predominante para la separación y análisis de proteínas para identificar proteínas de interés, seguido por espectrometría de masas, lo que convierte los perfiles obtenidos en las aplicaciones actuales de la tecnología proteómica (Monsinjon *et al.*, 2006). Adicionalmente, la proteómica permite identificar huellas moleculares de los cambios de expresión de una proteína después de la exposición a bajos niveles de contaminantes, donde la sensibilidad de los métodos convencionales de toxicología resulta ser insuficiente (Oberemm *et al.*, 2005).

Debido a la importancia comercial de *C. gigas* y al efecto adverso que la ingestión de dinoflagelados tóxicos del género *Prorocentrum* podría ocasionar en este molusco, así como la falta de información sobre su efecto en semillas de ostión (juveniles de 5-7 mm), en este trabajo se determinó el efecto de la exposición de *Prorocentrum* spp. en la expresión diferencial de proteínas de juveniles de ostión japonés *C. gigas*.

### **1.1. Características generales del ostión japonés *C. gigas***

*C. gigas*, o comúnmente llamada ostión japonés o del Pacífico, es un molusco bivalvo eurihalino que vive en sustratos firmes del fondo, adheridos a las rocas, desechos y conchas, desde la zona intermareal hasta profundidades de 40 m; sin embargo, también pueden encontrarse en fondos arenosos y lodosos (FAO, 2006). La coloración externa varía de blanquecina hasta amarillo cremoso, con estrías púrpura (Fig. 1A). La coloración interna va del blanco ópalo al perla sin llegar a ser iridiscente (Fig. 1B), en ocasiones con manchas amarillo-pardo (Pauley *et al.*, 1988; Castillo-Rodríguez y García-Cubas, 1986; FAO, 2006). Poseen un órgano muscular situado en la parte posterodorsal del cuerpo, que

se encuentra firmemente anclado a la cara interna de las valvas (músculo abductor), formado por músculo estriado y liso, que es empleado para la apertura y cierre de las valvas (FAO, 2006).



**Figura 1.** Anatomía de *C. gigas*. A, externa y B, interna.

La anatomía interna del ostión consiste en un cuerpo blando, alargado u ovoide color crema, cubierto por el manto, que es el tejido responsable de la síntesis de la concha y de las funciones sensoriales del organismo (Fig. 1B). Los palpos labiales presentan aproximadamente 75 ranuras o estrías, cubriendo la cara interna de ambos lados. Poseen un par de branquias de estructura laminar (Lamellibranchia) que constan cada una de dos pliegues paralelos vascularizados que se extienden en la región ventral, desde la boca hasta el ano, cuya actividad genera un complejo sistema de corrientes de agua que permite la recolección del alimento (FAO, 2006). El aparato circulatorio es parcialmente cerrado, basado en sistemas vasculares imbricados en la masa visceral y consta de: corazón, arterias, venas y senos abiertos. Las células sanguíneas no están confinadas a los vasos, suelen desplazarse en forma errante a través de tejidos y se concentran en los senos; la sangre es incolora y carente de pigmentos respiratorios como la hemoglobina o la hemocianina (Sevilla, 1993; FAO, 2006).

En lo referente a la alimentación, todo el sistema ciliar de las branquias es el encargado del transporte de las partículas alimenticias. En la parte basal de las branquias se localizan

unas líneas altamente ciliadas encargadas de llevar el alimento a la boca, donde da inicio el sistema digestivo. El aparato excretor está compuesto por dos riñones con nefridios bien desarrollados, conocido como *Órgano de Bojanus*, que ocupan un área triangular a ambos lados de la masa visceral (Sevilla, 1993; FAO, 2006).

El sistema reproductivo en bivalvos es extremadamente simple (Goslin, 2003). El ostión *C. gigas* es una especie hermafrodita protándrica alternante, lo que significa que generalmente los individuos se desarrollan como machos en la primera temporada reproductiva y posteriormente presentan cambio de sexo, alternando irregularmente en el mismo individuo, con un ciclo reproductivo anual que culmina con el desove y fertilización externa en la columna de agua (Eble y Scro, 1996; Guo *et al.*, 1998; Goslin, 2003).

El aparato reproductor del ostión consiste de una gónada hermafrodita, característica que le permite asegurar la supervivencia de la especie en las dinámicas condiciones de las zonas intermareales. Se encuentra situada en la masa visceral, entre la glándula digestiva y el manto (Eble y Scro, 1996), es un tejido que consiste en glándulas genitales acinares ramificadas que se extiende entre el tejido conectivo vesicular (Guo *et al.*, 1998), Conforme el desarrollo de la gónada progresa, los acinos se interconectan en el margen exterior de la masa visceral, adyacente a la región interna del manto, formando canales de desove que desembocan en la cavidad paleal (Eckerbarger y Davis, 1996). Su dimensión y morfología varía a lo largo del año debido a que este tejido se regenera anualmente con cada ciclo reproductivo, disminuyendo después de la emisión de gametos (Guo *et al.*, 1998) y después del desove o reabsorción de huevos y espermias no desovados, la gónada entra en fase de indiferenciación, en donde los folículos se hacen más pequeños, ampliamente separados y contienen solamente células indiferenciadas, entrando así a una fase de reposo fisiológico, por lo que la determinación de sexo no puede ser determinada en esta etapa (Eble y Scro, 1996).

El ostión acumula reservas en forma de glucógeno durante el otoño e invierno, para la producción de células sexuales que liberará a la entrada de la temporada cálida. Durante el desove el ostión puede liberar hasta 500 millones de huevos en una temporada. Bajo

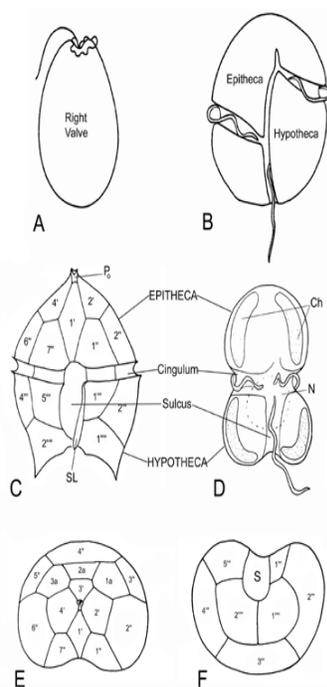
condiciones normales, cerca del 90% de los ovocitos fertilizados eclosionan y desarrollan un estadio de larva, los cuales a las 24 horas de la fecundación ya ha desarrollado su primera concha y por su forma se le conoce como larva “D” llegando a presentar una longitud de concha media de 55 a 75 micras en las ostras del género *Crassostrea* (Helm y Bourne, 2004). Durante su etapa pelágica o de vida libre, la larva es dispersada por el movimiento del agua, sujetas a mortalidades por depredación, enfermedades o quizás como resultado de la poca viabilidad y suministro de alimento. Esta etapa se prolonga por un periodo de dos a tres semanas, mientras crece y modifica su forma y comportamiento, las larvas que sobreviven, antes de convertirse en veliger y pediveliger desarrollan un órgano muscular retráctil llamado pié y un punto oscuro conocido como mancha ocular, siendo entonces cuando la larva inicia la búsqueda de un sustrato firme en el fondo para fijarse e iniciar su etapa de vida sésil, y si los estímulos apropiados ocurren, la larva se fija y ocurre la metamorfosis, dando lugar a un organismo juvenil de hábito sésil (Kennedy, 1996; Pauley *et al.*, 1988).

## **1.2. Dinoflagelados**

Los dinoflagelados (subfilum Dinoflagellata) son un grupo evolutivamente diverso que constituyen uno de los grupos más grandes de los eucariontes, seguidos en abundancia por las diatomeas (Hackett *et al.*, 2004). Son organismos predominantemente protistas flagelados unicelulares, generalmente uninucleadas o binucleadas, móviles ó inmóviles, que se encuentra en el plancton marino, de agua dulce y en las comunidades bentónicas, desde los polos hasta el ecuador. Este grupo está constituido por más de 2,000 especies vivas (y ~2,500 en registros fósiles), de las cuales aproximadamente el 50% son fotosintéticas, y el resto se alimentan por una variedad de mecanismos. Las especies fotosintéticas son los principales productores primarios, desempeñando un papel fundamental en el ecosistema acuático, incluyendo relaciones endosimbióticas importantes, como por ejemplo las zooxantelas de los corales formadores de arrecifes coralinos (Hackett *et al.*, 2004).

Los dinoflagelados poseen estructuras únicas que permiten llevar a cabo su identificación, una de ellas es la presencia de dos flagelos desiguales localizados en ranuras

o depresiones, que de acuerdo a su arreglo pueden clasificarse en: 1) **desmocontes**, que poseen dos flagelos disimiles emergiendo de la parte anterior de la célula (Fig. 2A) y 2) **dinocontes**, en los que uno de los flagelos forma un círculo lateral (flagelo transversal) y el otro se extiende hacia abajo (flagelo longitudinal) (Fig. 2B) (Taylor, 1987). Otra forma muy común de clasificar a estos organismos es de acuerdo a, la presencia de estructuras duras o teca: 1) **tecados** y 2) **desnudos o atecados** (Balech, 1988). Los primeros tienen una célula encerrada en una teca formada por placas separables (Fig. 2C, E y F) y los segundos carecen de ella (Fig. 2D).



**Figura 2.** Características morfológicas de los dinoflagelados. A) Célula tipo desmoconte, B) célula tipo dinoconte, C) vista ventral de una célula tecada peridinioid, D) vista ventral de una célula atecada gymnodinioid, E) vista apical de placas en la epiteca, F) vista antapical de placas de la hipoteca. Ch = cloroplastos; N = núcleo; Po = placa del poro apical; SL = **sulcus**. Tomado de Steidinger y Tangen, 1997 (A, B) y Taylor, 1987 (C-F).

### 1.3. Florecimientos algales nocivos (FANs)

Las proliferaciones de microalgas (también conocidos como florecimientos algales nocivos o FAN) son eventos de multiplicación y acumulación de estos microorganismos, en periodos de horas a días, que ocurren bajo determinadas condiciones ambientales, favoreciendo el crecimiento de unas especies más que otras. Se caracterizan por cambios en la tonalidad de la superficie del agua en determinadas áreas, delimitadas tanto en extensión como en profundidad. Este fenómeno involucra a diversas clases de organismos planctónicos como: Bacillariophyceae (diatomeas), Chlorophyceae (algas verdes o

clorofitas), Dinophyceae (dinoflagelados) y Cyanophyceae (cianobacterias) (De León, 2002; Ochoa *et al.*, 2003).

A nivel mundial, los FAN han cobrado una connotación alarmante debido al aparente incremento de su frecuencia, intensidad y distribución geográfica (Moreno *et al.*, 2004; Hernández-Orozco y Gárate-Lizárraga, 2006). Aunado a esto, se ha reportado que entre el 50-75% de las proliferaciones algales analizadas hasta la fecha han sido tóxicas. Actualmente, se conocen alrededor de 5,000 especies fitoplanctónicas, de las cuales unas 300 presentan altas tasas de proliferación bajo determinadas circunstancias. De estas 300 especies, más de 40 de dinoflagelados y diatomeas, producen ficotoxinas, lo que las convierte en el mayor grupo de microalgas productoras de toxinas. Las toxinas se clasifican en base a sus propiedades químicas en dos grupos principales: 1) las toxinas hidrofílicas y 2) las toxinas lipofílicas. Dentro del grupo de las lipofílicas se encuentran aquellas que causan el envenenamiento neurológico por mariscos (Neurotoxic Shellfish Poisoning o NSP, por sus siglas en inglés), la intoxicación diarreica por mariscos (Diarrhoeic Shellfish Poisoning o DSP, por sus siglas en inglés) y la intoxicación azaspirácida por mariscos (Azaspiracid Shellfish Poisoning o AZP, por sus siglas en inglés) (Gerssen *et al.*, 2010). Si bien no todas las proliferaciones de una especie en particular pueden ser tóxicas, estas llegan a variar marcadamente tanto en tiempo como en espacio (Carmichael y Gorham, 1981).

En México, se han presentado eventos FAN en prácticamente todas las costas (Golfo de México, Mar Caribe, Pacífico y Golfo de California), y algunas de ellas han causado serios problemas de salud pública y animal, en animales silvestres y de cultivo (Núñez-Vázquez *et al.*, 2008). En el Golfo de California, estos eventos son comunes durante todo el año, y se han descrito las principales especies de microalgas (nocivas o no) asociadas a dicha área geográfica (Ochoa *et al.*, 1997; Cortés-Altamirano, 1998; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2001 y 2008; Alonso-Rodríguez y Páez-Osuna, 2003). Particularmente, en la Bahía de La Paz, desde 1984 se han reportado más de 40 florecimientos causados por 25 diferentes taxas, pertenecientes a diferentes grupos de fitoplancton: dinoflagelados, diatomeas, rafdofitas y cianobacterias (Gárate-Lizárraga y Muñetón-Gómez, 2008).

#### 1.4. Características generales del género *Prorocentrum*

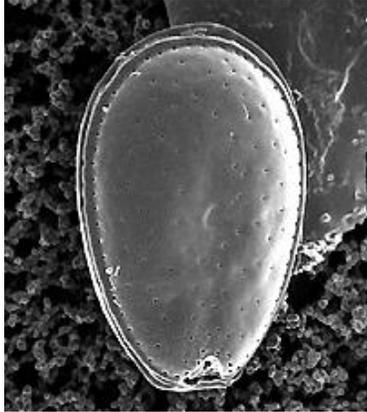
Debido al gran número y abundancia de especies productoras de toxinas, el género *Prorocentrum* es uno de los más importantes entre los dinoflagelados tóxicos (Delgado *et al.*, 2002). Estas especies son frecuentes en zonas costeras (Wikfors y Smolowitz, 1995), registrándose proliferaciones en varios estados de la República Mexicana (Fig. 3) y, particularmente en el Golfo de California donde es frecuente la aparición de *Prorocentrum lima*, *Prorocentrum minimum*, *Prorocentrum mexicanum* (*Prorocentrum rathymum*; Cortés-Altamirano y Sierra-Beltran, 2003) y *Prorocentrum dentatum* (Ochoa *et al.*, 2002).



**Figura 3.** Distribución del género *Prorocentrum* en las costas de la República Mexicana. En azul se indican los estados en los que se han reportado dinoflagelados del género *Prorocentrum*. Los círculos indican los registros de: *P. lima* (verde), *P. rathymum* (rojo) y *P. minimum* (amarillo). (Modificado de: de las Heras, 2009).

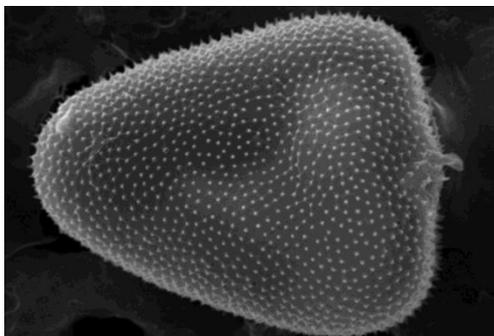
*P. lima* (Dodge, 1975) es una especie bentónica, ampliamente distribuida tanto en regiones templadas como tropicales de la zona litoral y nerítica. Son células generalmente ovaladas, con teclas gruesas, que presentan dos cloroplastos laterales y uno o dos pirenoides largos y centrales (Fig. 4). Presentan un poro flagelar, un núcleo posterior y una depresión en forma de V en la parte anterior (Delgado *et al.*, 2002). Miden entre 32-50  $\mu\text{m}$  de largo y 20-28  $\mu\text{m}$  de ancho (Dodge, 1982), y producen un conjunto de toxinas poliéter, de las que

algunos componentes son agentes causantes de la intoxicación diarreica por consumo de mariscos en humanos (DSP) (Pan *et al.*, 1999).



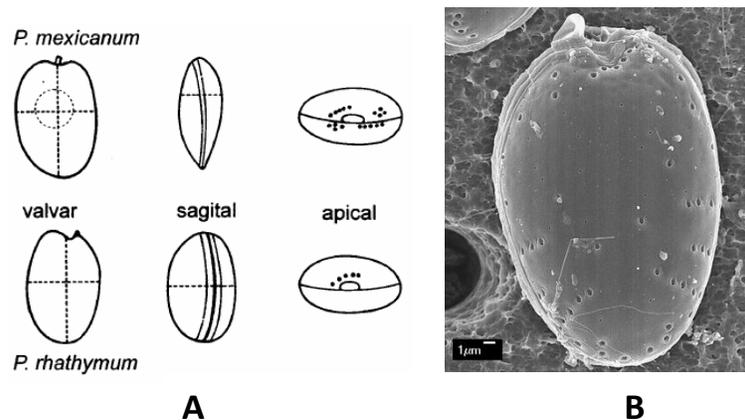
**Figura 4.** Fotografía tomada mediante SEM de *P. lima*, donde se observa la forma oblonga u oval de las células con la parte anterior reducida, los poros marginales, poros dispersos en la superficie y la banda intercalar (Tomado de Faust, 1991).

*P. minimum* (Schiller, 1933) es una especie cosmopolita, ampliamente distribuida y estacionalmente abundante en aguas costeras, especialmente en las zonas de estuarinas (sobre todo en verano) en los climas tropicales, subtropicales y templados. Varía considerablemente en forma, por lo que su taxonomía es compleja (Fott, 1971; Marshall, 1997; Heil *et al.*, 2005). Su amplia distribución se debe a la flexibilidad fisiológica y a la capacidad de utilizar nitrógeno (inorgánico y orgánico), fósforo y carbono como fuente de nutrientes; es una especie euritérmica y eurihalina. Las células de *P. minimum* presentan forma ovalada (Fig. 5) y miden de 18 a 20  $\mu\text{m}$  de longitud y de 15 a 16  $\mu\text{m}$  de ancho (Dodge, 1982); la especie es un miembro importante del fitoplancton, ya que puede llegar a ocasionar proliferaciones (Heil *et al.*, 2005).



**Figura 5.-** Fotografía tomada mediante SEM de *P. minimum*, observándose la forma oval de la célula con una amplia región apical truncada y superficie de la teca con numerosas espinas anchas y cortas. (Tomado de Faust *et al.*, 1999).

*P. rhathymum* (Löeblich, Sherley et Schmidt 1974) es un dinoflagelado epibéntico que se encuentra generalmente en las zonas tropicales y subtropicales. Su identificación ha sido confusa y podría haber sido reportado como *Prorocentrum mexicanum*, ya que estas dos especies habían sido consideradas como sinónimos hasta su descripción detallada por Cortés-Altamirano y Sierra-Beltrán (2003), quienes la describen como células ovales, que presentan una banda intercalar ancha de superficie lisa, con ausencia de pirenoides y con una fila de seis a siete tricocistos que emergen de la parte ventral anterior de la valva (Fig. 6). *P. rhathymum* ha sido descrita como una especie toxica por diversos autores (Yasumoto *et al.*, 1987; Tindall *et al.*, 1989; Pearce *et al.*, 2005), quienes reportan la producción de toxinas lipofílicas. Sin embargo, Aligizaki *et al.* (2009) no encontró ácido okadaico ni análogos, mientras que por el contrario, Caillaud *et al.* (2010) reportan haber detectado ácido okadaico (AO) en una cepa de esta especie, mediante análisis de la inhibición de la proteína fosfatasa (PP1A), análisis celulares de neuroblastoma (Neuro-2a CBA) y análisis de LC-MS/MS.



**Figura 6.** Comparación esquemática de las principales características morfológicas y de ornamentación entre *P. mexicanum* y *P. rhathymum*. Panel A. Vista valvar; se observa la forma ovalada de las células, con una pequeña espina apical en *P. rhathymum* y con un pirenoide central de forma circular en *P. mexicanum*. Panel B. Microfotografía electrónica de barrido de *P. rhathymum*, en donde se muestra la superficie lisa de la teca y poros de la valva radialmente dispuestos y perpendiculares a la orilla de la valva. (Tomado de Cortés-Altamirano y Sierra-Beltrán, 2003; Caillaud *et al.*, 2010).

### **1.5. Aplicaciones de la proteómica en ecotoxicología de bivalvos**

En varias disciplinas de las ciencias marinas existe un interés creciente para entender los diversos mecanismos celulares de respuesta ante alteraciones en el ambiente físico y químico, incluyendo modificaciones en la temperatura, osmolaridad, concentración de oxígeno y contaminantes, así como los mecanismos de desarrollo, de infecciones y simbiosis. La proteómica, con su rápida expansión como herramienta analítica, proporciona un medio ideal para estudiar los cambios que ocurren a nivel del proteoma, incluyendo los procesos de síntesis de proteínas, modificaciones postraduccionales y degradación, en respuesta tanto al entorno externo como a eventos ontogénicos en organismos marinos, plantas y bacterias. La proteómica ha permitido dilucidar la forma en la que el ambiente afecta la biología de los organismos marinos, describiéndose efectos celulares desconocidos ante factores de estrés ambientales, tales como variaciones en las condiciones térmicas, osmóticas y anaeróbicas (Tomanek, 2011).

El término proteoma fue usado por vez primera en 1994 por Marc Wilkins para describir el conjunto de proteínas codificadas por un genoma, en una célula o un tejido. De forma imperceptible, la palabra proteoma dio lugar a una nueva disciplina, la Proteómica, la cual es un nuevo enfoque en el estudio funcional de la expresión cuantitativa, modificaciones postraduccionales e interacciones entre proteínas, que emplea una serie de técnicas, como la espectrometría de masas y sobre todo, herramientas bioinformáticas que ayudan a extraer información de bases de datos y a correlacionarlas con los datos de masas obtenidos experimentalmente, permitiendo estudiar el total de las proteínas expresadas por un organismo (Gromov y Celis, 2000; Wright *et al.*, 2012; Sánchez *et al.*, 2011).

Los análisis proteómicos de organismos contaminados han puesto de manifiesto los cambios que ocurren durante la respuesta inmune, y la forma en la que las rutas metabólicas son atenuadas; así como también han ayudado a detectar cambios sutiles relacionados con la contaminación, tales como respuestas a mezcla de contaminantes en bajas concentraciones, donde los signos claros de toxicidad están ausentes (Monsinjon *et al.*, 2006; Tomanek, 2011).

Debido a su medio ambiente y al contacto continuo con los sedimentos acuáticos, que pueden actuar como reservorios para muchos contaminantes ambientales, los invertebrados acuáticos son especies centinelas utilizados en los estuarios y los programas de vigilancia costera. Sin embargo, hasta la fecha pocos estudios proteómicos han utilizado estos organismos clave para estudiar los impactos de los contaminantes ambientales en los ecosistemas acuáticos o para el descubrimiento de biomarcadores (Sánchez *et al.*, 2011). De los estudios realizados, la mayoría se han centrado en especies de bivalvos como mejillones marinos del género *Mytilus*, utilizando análisis proteómicos con la finalidad de generar una firma de expresión de proteínas (Protein Expression Signature o PES, por sus siglas en inglés), que es una mancha única de una proteína con un patrón específico a un tratamiento, detectadas a través de electroforesis en gel de dos dimensiones (2-D) y la posteriormente inidentificadas.

Dentro de los estudios llevados a cabo en el género *Mytilus* que reportan el uso de perfiles de expresión de proteínas después de la exposición a una variedad de contaminantes ambientales, se pueden mencionar los trabajos efectuados por Shepard y Bradley (2000) y Shepard *et al.* (2000) quienes identifican PES a partir organismos expuestos a diversas concentraciones de cobre, policlorofenilos (PCBs) y a estrés por salinidad. Olsson *et al.* (2004) y Knigge *et al.* (2004) midieron la respuesta al estrés de *M. edulis* expuestos a contaminantes orgánicos PHAs y a PCBs; Manduzio *et al.* (2005), Jonsson *et al.* (2006) y Monsinjon *et al.* (2006) realizaron estudios exponiendo organismos a petróleo crudo, y López *et al.* (2001, 2002a) y López (2005) realizaron estudios para observar diferencias en la expresión de proteínas entre mejillones (*M. galloprovincialis*) de la zona intermareal y organismos cultivados. De igual manera, realizaron estudios comparativos de los perfiles proteicos entre especies emparentadas de mejillones (*M. edulis* y *M. galloprovincialis*) así como análisis comparativos de los mapas de expresión proteica entre larvas de *M. galloprovincialis* y 5 especies de bivalvos (*Ostrea edulis*, *Cerastoderma edule*, *Pecten maximus*, *Tapes decussates* y *Venarupis pullastra*).

Otras especies de bivalvos en las que se han empleado este tipo de análisis son las almejas, en las que se han realizado estudios de toxicología ambiental examinando perfiles

proteómicos de *Scrobicularia plana* que habitan en estuarios de Guadalquivir, España (Romero-Ruiz *et al.*, 2006). También, se han examinado los efectos del Cd en tejidos de riñón, branquias y glándula digestiva de *Patinopecten yessoensis* (Huang *et al.*, 2011), así como el potencial de ubiquitinación y carbonilación (como marcadores de estrés oxidativo) en *Ruditapes decussatus* (Chora *et al.*, 2008, 2009); estas técnicas también se han empleado para el estudio de la afinidad del glutatión (GSH) sobre branquia, glándula digestiva y manto de *Tapes semidecussatus* (Dowling *et al.*, 2006). Finalmente, la proteómica se ha aplicado para observar los cambios de expresión de proteínas en la almeja *Chamaelea gallina* expuesta a cuatro contaminantes: Aroclor 1254, cobre (II), tributilestaño (TBT) y arsénico (III) (Rodríguez-Ortega *et al.*, 2003).

En lo que respecta a estudios de este tipo realizados en el género *Crassostrea*, la información es muy escasa, y se pueden mencionar los estudios realizados por Meiller y Bradley (2002) quienes demostraron el efecto ocasionado en organismos expuestos a zinc. Tomanek *et al.* (2010), analizaron los cambios proteómicos asociados con la exposición de ostiones a niveles elevados de la presión parcial de CO<sub>2</sub> (PCO<sub>2</sub>) y, dado que este género es de importancia comercial, los estudios realizados han tenido otro enfoque, como es el caso de Li *et al.* (2010), quienes mediante los perfiles de proteínas de hemolinfa han desarrollado un nuevo método para la determinación precisa del sexo y la etapa de desarrollo gónadal en reproductores.

## **2. Antecedentes**

En el 2007-2008 se realizaron trabajos para describir el efecto toxico de organismos del género *Prorocentrum* en moluscos filtradores de importancia comercial, considerando como organismo modelo al ostión de pacifico *C. gigas* (Sierra-Beltrán, 2008). Para estudiar el efecto de las toxinas de algunas especies del género *Prorocentrum*, en estos trabajos se consideró la exposición de *C. gigas* (2-3 mm) a células completas (diversas densidades celulares) y/o sus extractos acuosos u orgánicos de tres especies: *P. lima*, *P. rathymum* (especies tóxicas productoras de toxinas DSP) y *P. mínimum* (no toxica), observando de manera general: Emaciación, atrofia y edemas en músculo y branquias; melanosis, infiltración hemocítica e hiperplasia en el manto y anomalías en la gametogénesis causadas

tanto por células completas como por extractos, con presencia de espermatocitos en las gónadas de los organismos expuestos a *P. rathymum* y *P. minimum* y ovocitos previtelogénicos y vitelogénicos en los organismos expuestos a *P. lima*, dando como resultado 19 machos, 3 hembras y 1 hermafrodita (de 330 organismos totales). Lo anterior sugiere que el desgaste energético, provocado por el desarrollo temprano de tejido gonadal y la implementación de mecanismos de defensa a los dinoflagelados tóxicos, afectan la respuesta inmune de los organismos aumentando la susceptibilidad a patógenos y a cambios ambientales que podrían considerarse normales bajo condiciones fisiológicas óptimas (de las Heras, 2009).

### **3. Justificación**

Dado su elevado valor comercial y demanda en el mercado, el ostión *C. gigas* es una de las especies de mayor importancia para la acuicultura, siendo el bivalvo marino más cultivado en el mundo. En México, la especie fue introducida en 1973 como cultivo experimental, y no fue sino a partir de 1977 cuando se inició el cultivo a nivel de producción comercial, lográndose consolidar en una década como una actividad económica importante. Sin embargo, al igual que en muchos de los países productores de esta especie, se han presentado diversos problemas relacionados con la mortalidad, incrementándose notablemente durante los meses de verano, afectando semillas, juveniles y adultos. Se ha mencionado que dicha mortalidad podría tener alguna interacción con la condición metabólica, reproductiva y genética de los organismos, sin embargo, aún se desconoce con certeza la causa.

Los estudios realizados con juveniles de *C. gigas* (5-7 mm) son muy escasos, a pesar de que a partir de esta talla es cuando inicia la preengorda en ambientes abiertos, y dado que las especies del género *Prorocentrum* se encuentran ampliamente distribuidas a lo largo del Pacífico y el Golfo de California, existe una alta probabilidad de que estos organismos sean ingeridos por el ostión, afectando su crecimiento, supervivencia y generando grandes pérdidas económicas. Por lo anterior, se considera que se debe generar información para estudiar y entender la respuesta fisiológica observada, usando la expresión de proteínas como un acercamiento metodológico que permita explicar la participación de las proteínas

reguladas en las rutas metabólicas involucradas, prestando mayor atención a los procesos básicos.

#### **4. Hipótesis**

Si la exposición de *C. gigas* a microalgas del género *Prorocentrum* causa alteraciones fisiológicas e histológicas, entonces existirán cambios en las rutas metabólicas y, por lo tanto, en los patrones de expresión de algunas proteínas

#### **5. Objetivos**

##### **5.1. Objetivo general**

Caracterizar la expresión diferencial de proteínas en juveniles de 5-7 mm de ostión japonés *Crassostrea gigas* expuestos a organismos del género *Prorocentrum* spp.

##### **5.2. Objetivos particulares**

- Reconocer cualitativamente las proteínas asociadas a la respuesta del ostión ante el estrés ocasionado por el género *Prorocentrum* spp.
- Identificar las proteínas expresadas diferencialmente determinando la ruta metabólica a la que pertenecen.
- Integrar, parcialmente, la información obtenida en los objetivos anteriores de acuerdo a la función biológica de cada una de las proteínas.

## 6. Materiales y métodos

### 6.1. Organismos

Los juveniles de ostión japonés *C. gigas* (5-7 mm) fueron obtenidos de “Acuicultura Robles SPR de RI” y aclimatados a 21°C y 34 UPS en el Laboratorio Húmedo de Seguridad Biológica (LHSB) del CIBNOR.

Los dinoflagelados empleados en los bioensayos fueron: *Prorocentrum lima* (PLHV-1), *Prorocentrum rhathymum* (PXPV-1), y *Prorocentrum minimum* (PIPV-1), obtenidos de la Colección de Dinoflagelados Marinos del CIBNOR, S. C. (CODIMAR). *P. lima* fue cultivado en medio F/2 (Guillard y Ryther, 1962), mientras que *P. minimum* y *P. rhathymum* se cultivaron en medio GSe que es una modificación del GP en el que se incluye extracto de suelo (Arredondo y Band, 2000). Los cultivos se llevaron a cabo empleándose la técnica normal de escalamiento de un volumen de 10 mL hasta un volumen final de 1 L en matraces Fernbach estériles de 2 L a una temperatura de 21 °C, con iluminación durante 24 h ( $150 \mu\text{E m}^2\text{s}^{-1}$ ) utilizándose para los experimentos cultivos de dinoflagelados en su fase exponencial de crecimiento.

### 6.2. Obtención de extractos

Los extractos se obtuvieron mediante una modificación del método de Yasumoto (Lagos, 2002 en Sar *et al.*, 2002), el cual consiste en la centrifugación de 50 mL de cada cultivo de dinoflagelados (a 1500  $\times g$ , 4°C por 10 min), con una concentración total de células de: *P. lima*  $2.95 \times 10^6$ ; *P. rhathymum*  $1.35 \times 10^6$  y *P. minimum*  $9.4 \times 10^6$ . El botón de células se extrajo con 10 volúmenes de metanol al 80% y después de la adición del diclorometano (V:V) se separaron las fases acuosa (superior) y orgánica (inferior); ambas fracciones se secaron por destilación al vacío. La fase orgánica (EO) se disolvió en 5 mL de 1% Tween 60 (Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo. USA) y la fase acuosa (EA) en 5 mL de agua destilada. En el caso de los extractos acuosos de *P. lima* y *P. rhathymum* fueron obtenidas reemplazando el diclorometano por éter (V/V), eliminando las trazas de éste compuesto mediante evaporación en un baño maría a 50 °C durante 15 min.

### **6.3. Diseño experimental**

El diseño experimental consistió en los siguientes dos ensayos: en el primero, juveniles de *C. gigas* (5-7 mm) fueron expuestos a extractos crudos orgánico (EO) y acuoso (EA) de los cultivos de *P. lima*, *P. rhathymum* y *P. minimum*, aplicando diluciones 1:50, 1:100 y 1:200. Los controles usados para las diluciones fueron 1:50 de 1% de Tween 60 y 1:50 de agua destilada para extractos acuosos y orgánicos, respectivamente. En el segundo bioensayo, los ostiones fueron expuestos a células completas de las tres especies de dinoflagelados (cada una por separado) aplicando densidades celulares de 1 200, 2 400, 3 600, 4 800 y 6000 cel mL<sup>-1</sup>, usando como tratamiento control 6 000 cel mL<sup>-1</sup> de *Isochrysis galbana*. Ambos experimentos se realizaron por triplicado, en cajas de cultivo de células de 6 pozos de fondo plano (BD Falcon Multiwell Flat-Bottom sterile plates, Cat. 62406-155) con 10 organismos de *C. gigas* en cada pozo en 1/3 del volumen total (5 mL -15.5 mL de volumen total/pozo-) haciendo recambios diarios tanto de las diluciones de los extractos como de las células completas. Se realizaron observaciones a las 18, 42, 65 y 72 h de exposición a los diferentes tratamientos, retirando en cada ocasión los organismos muertos conservándolos a -80°C hasta su posterior procesamiento.

### **6.4. Extracción de proteínas totales**

El extracto crudo de proteínas se obtuvo macerando con un pistilo de vidrio, durante 3 min en baño de hielo 10 organismos de cada replica en tubos Eppendorf de 1.7 mL con 250 µL de buffer de fosfatos (pH 7.8) frío (4 °C) que contenía un coctel de inhibidores de proteasas al 0.01% (SIGMA-ALDRICH). Posteriormente, los homogenados se centrifugaron a 8,900xg, 4 °C durante 10 min., en una microcentrífuga refrigerada (Beckman, Mod. GS-15R). Se recuperaron los sobrenadantes, realizándose diluciones 1:25 y 1:50, para determinar la concentración de proteínas mediante el método de Lowry (1951); el resto de la muestra se congeló a -20 °C hasta su uso posterior.

## **6.5. Electroforesis 2-D**

### **6.5.1. Separación en la primera dimensión: Isoelectroenfoque (IEF)**

Se emplearon tiras ReadyStrip® IPG de 7 cm con un gradiente de pH de 3 a 10 (Bio-Rad, #163-2000), sobre las cuales se colocaron 250 µg de proteína (muestra) previamente mezclada con buffer de muestra/rehidratación (8 M urea, 2% CHAPS, 50 mM DTT, 0.2% (w/v) Bio-Lyte® 3-10 anfolitos y azul de bromofenol, dejándose hidratar por 14 h a 20 °C. Después de la rehidratación, la electroforesis se llevó a cabo en un PROTEAN® IEF Cell (Bio-Rad, Cat. 165-4000) bajo los siguientes parámetros: 20 min en gradiente hasta 250 V-h, 120 min en gradiente hasta 4,000 V-h y 160 min en gradiente hasta 10,000 V-h, con un total de 14,000 V-h en un tiempo de 5 h a 20 °C. Durante todo el proceso de IEF la intensidad de la corriente se limitó a 50 µA por tira, para evitar sobrecalentamiento y la degradación de la muestra.

### **6.5.2. Segunda dimensión SDS-PAGE**

Posterior al desarrollo de la primera dimensión, las tiras se equilibraron en dos pasos de 10 min cada uno. En el primer paso se empleó el buffer de equilibrio I (6 M urea, 2% SDS, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 20% de glicerol y 2% (w/v) de DTT) al cual se le adicionó 13.35 mL de glicerol al 30% por cada 20 mL. Posteriormente, las tiras se equilibraron con buffer de equilibrio II (similar al anterior, sin DTT) al cual se le adicionó en la misma proporción glicerol, además de 0.5g de yodoacetamida por cada 20 mL de buffer. Las tiras IPG focalizadas se colocaron sobre un gel de poliacrilamida-SDS al 12% de 1.5 mm de espesor. Previamente, se agregó 1.5-2.0 mL de una solución compuesta de agarosa 0.5% en Tris 25mM, 192 mM glicina, 0.1% SDS y X% azul bromofenol, para evitar el movimiento de la tira al quedar fija en la agarosa solidificada. Las electroforesis se llevaron a cabo en un equipo de electroforesis vertical Mini-protean II Cell (Bio-Rad, Cat. 165-2941) a un voltaje constante de 100V durante 40 min; para cada una de las muestras se realizaron geles 2-D por triplicado para asegurar su reproducibilidad.

### **6.5.3. Tinción de geles**

Las proteínas se visualizaron tiñendo los geles con una solución de Azul Brillante Coomassie R-250 (5% de sulfato de aluminio-(14-18)-hidratado, 0.2% Coomassie Brilliant Blue G-250, en 10% metanol y 2% ácido orto-fosfórico), durante 3 h en agitación suave, previos 2 lavados de 10 min (c/u) con agua destilada. Posteriormente, los geles se enjuagaron con agua destilada y se destiñeron con una solución a base de metanol (10% etanol 96% y 2% ácido orto-fosfórico) durante 1 h o hasta eliminar completamente el colorante en el gel. Finalmente, los geles fueron lavados 2 veces en agua destilada durante 5 min y documentados (UMAX PowerLook 2100XL) y almacenados a 4 °C.

### **6.5.4. Análisis de geles**

Las imágenes digitales de los geles se analizaron mediante el software Melanie7.0, usando los parámetros establecidos por el programa, a partir del cual se compararon por separado las distintas muestras, es decir cada tratamiento con su respectivo control, lo que permitió obtener los patrones de las proteínas e identificar los puntos (proteínas) expresados diferencialmente, en cada caso. Para lo cual primeramente fueron cargadas las imágenes de cada uno de los tratamientos con sus respectivos controles, estandarizando la calidad de las imágenes, posteriormente se genera una vista previa de los resultados de la detección, cada uno de los cuales fueron revisados y editados de manera manual en caso de que así lo hayan requerido, esto con la finalidad de que el análisis no tomara en cuenta algún punto o mancha que no correspondiera a alguna proteína. Después se compara el control con cada uno de los tratamientos y sus respectivas replicas buscando los puntos que coincidan en cada uno de ellos, así como también aquellos que presentan expresión diferencial.

Para analizar las variaciones de expresión de proteínas entre las diferentes condiciones (grupos de tratamiento), fue necesario definir clases. Una clase es un conjunto de geles que incluye todas las muestras de una condición dada (grupo de tratamiento con el control). De forma predeterminada, Melanie7.0 utiliza el Vol% (volumen relativo) para la cuantificación. Como resultado se obtuvo una tabla de análisis en donde los valores

calculados para cada uno corresponden a la media y MSD (Desviación media cuadrada), de donde se analizaron solamente los puntos de proteínas más interesantes, limitando el análisis a los puntos que mostraran variaciones de expresión estadísticamente significativas entre los grupos (ANOVA  $<0.05$ ).

Para la selección de los puntos de proteína para el análisis de masas se consideraron dos criterios principales:

1) Se seleccionaron las proteínas que presentaron una expresión diferencial con significancia estadística (considerando una  $p < 0.05$  en el análisis de ANOVA) entre los tratamientos, y

2) Aquellas proteínas que se encontraron bien definidas y separadas, con la finalidad de evitar que al momento de cortar los puntos manualmente para su análisis posterior se tomaran fragmentos no deseados de otras proteínas.

#### **6.5.5. Identificación de proteínas por espectrometría de masas**

Las proteínas (spots) seleccionadas fueron analizadas en el Laboratorio de Proteómica del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (Unidad Irapuato) a través de la contratación del servicio de secuenciación de péptidos mediante digestión con tripsina y posterior análisis MS. La identificación de las proteínas se realizó por medio del análisis de alineamiento de los péptidos obtenidos, con aquellas proteínas registradas en la base de datos del National Center of Biotechnological Information (NCBI) utilizando el programa BLASTP, para asignarles una identidad y, finalmente, integrar la información obtenida infiriendo la función de la proteína en alguna ruta metabólica específica de *C. gigas*.

## 7. Resultados

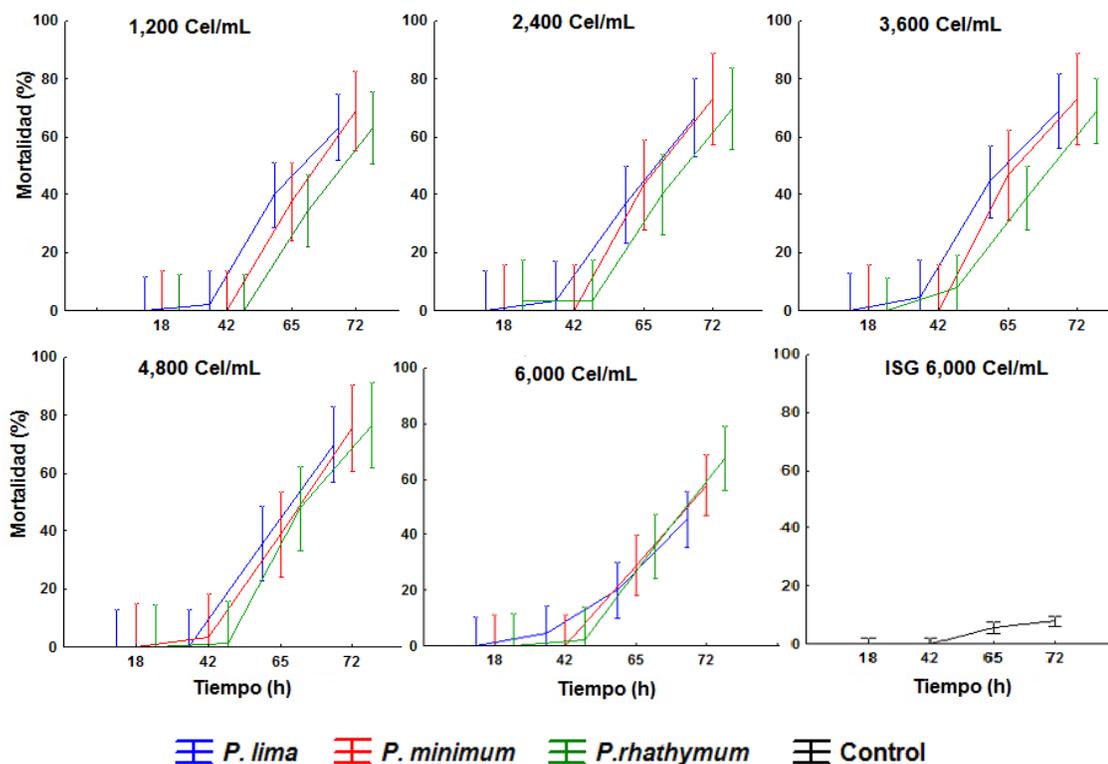
### 7.1. Mortalidad

Durante el bioensayo se observó mortalidad en los juveniles de *C. gigas* tanto en el experimento con la ingestión de células completas como en el de extractos de dinoflagelados. El mayor número de organismos muertos se presentó a las 65 h de iniciado el experimento, sin alcanzar el 100% al final del mismo.

En los organismos expuestos a células completas, *P. minimum* provocó la mayor mortalidad, seguido de *P. rhathymum* y *P. lima*. Esta última provocó la excreción de una mayor cantidad de pseudo-heces y se observó crecimiento de la concha. Con *P. rhathymum* la producción de pseudo-heces fue menor y con *P. minimum* no se observaron, en este último caso los organismos filtraron todo el material suspendido dejando el agua completamente limpia. La mayor mortalidad se presentó en los organismos expuestos a 6,000 cel mL<sup>-1</sup> de *P. minimum* (83.3%), mientras que en *P. rhathymum* y *P. lima* las mortalidades fueron de 80 y 76.6% respectivamente disminuyendo en relación a la concentración celular (Fig. 7); en el grupo control la mortalidad registrada fue del 6.67% a la misma concentración.

Al igual que en los organismos expuestos a células completas, en los organismos expuestos a extractos acuosos (EA, Fig. 8) u orgánicos (EO, Fig. 9) la mayor mortalidad se presentó a las 65 h de iniciado el experimento y a una dilución 1:50, observándose un efecto directamente proporcional entre la mortalidad y la dilución usada de cada tipo de extracto. Con los EA la mortalidad más alta se registró al termino del experimento con *P. rhathymum* (86.6%), seguida de *P. lima* (80%) y *P. minimum* (73.3%). Con el EO la mortalidad más alta se registró con la dilución 1:50; con este tipo de extracto las tres especies de *Prorocentrum* presentaron porcentajes similares de mortalidad (76.6%).

Para comparar el efecto ocasionado por cada uno de los factores considerados (número de células mL<sup>-1</sup>, especie, tiempo de exposición) sobre la mortalidad en cada uno de los experimentos, el análisis de varianza (ANOVA) de 2 vías mostró lo siguiente:



**Figura 7.** Mortalidad de juveniles de ostión *C. gigas* expuestos a células completas (1,200; 2,400; 3,600; 4,800 y 6,000 cel mL<sup>-1</sup>) de *P. lima*, *P. minimum* y *P. rhathymum*.

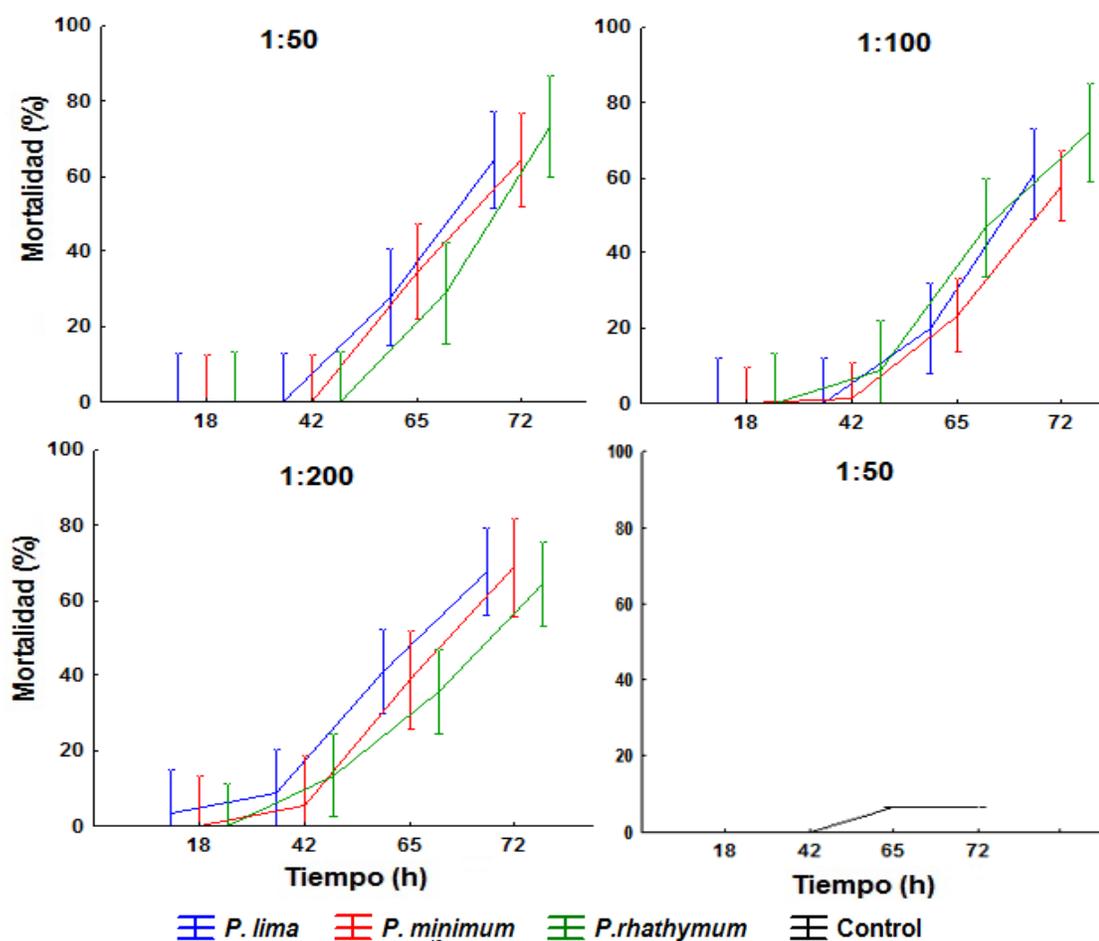
Los resultados obtenidos en el experimento con células completas indican que:

1. La concentración (densidad) celular no influye de manera significativa ( $p < 0.05$ ) en la mortalidad, y
2. existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el tiempo de exposición (65 h) y *P. minimum* respecto a *P. lima* y *P. rhathymum*.

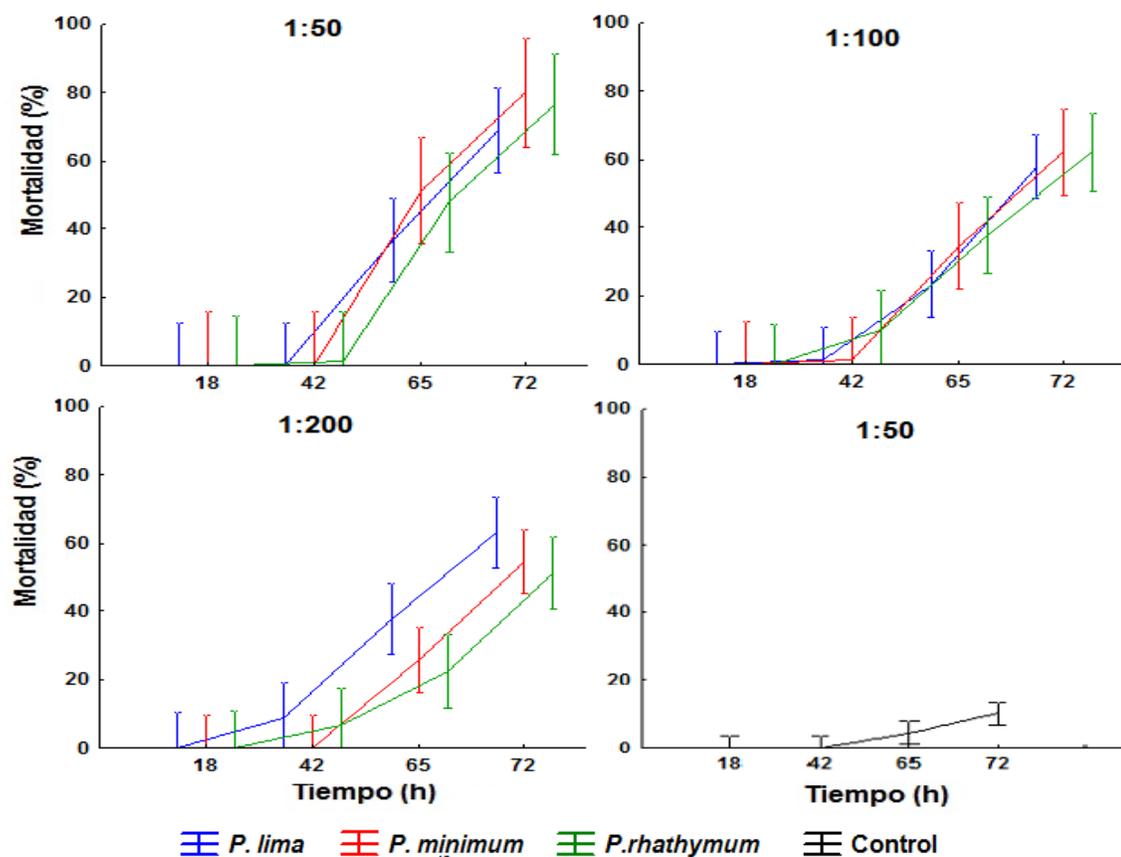
Así mismo, los resultados obtenidos en los experimentos con extractos muestra que:

1. No se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las diluciones probadas de ambos extractos (EA y EO), por lo que la concentración del extracto no es un factor que afecta la mortalidad. Solamente se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el tiempo de exposición, esto es a las 65 y 72 h de haber iniciado el experimento,

2. en el tratamiento con EA se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los organismos expuestos a *P. lima* con respecto a los de *P. rhathymum* y *P. minimum* (fig 8),
3. Con el EO se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los organismos expuestos a *P. rhathymum* respecto a los de *P. lima* y *P. minimum* (fig 8).



**Figura 8.** Mortalidad de juveniles de *C. gigas* expuestos a diluciones de EA de *P. lima*, *P. minimum* y *P. rhathymum*.

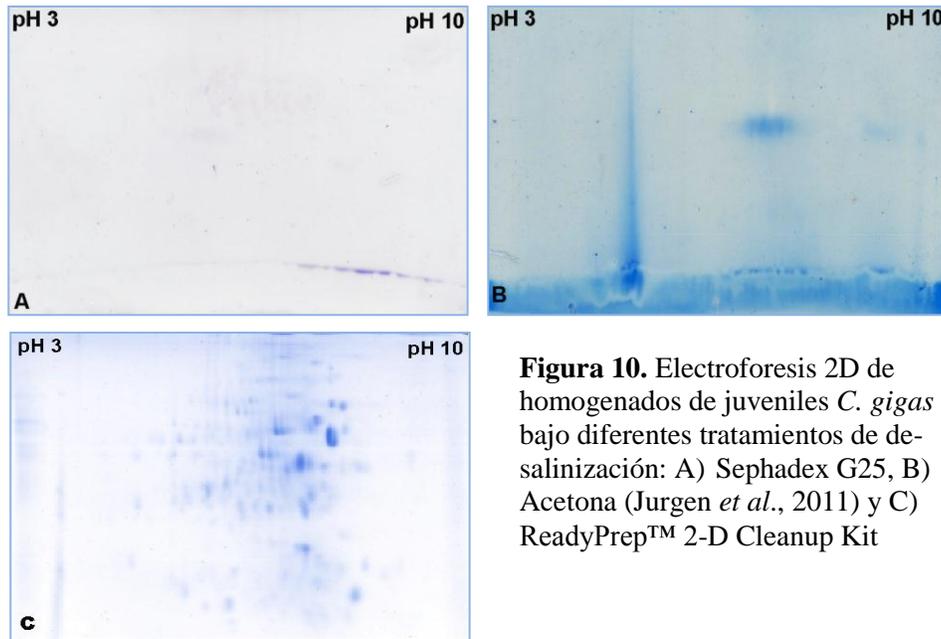


**Figura 9.** Mortalidad de juveniles de *C. gigas* expuestos a diluciones de EO de *P. lima*, *P. minimum* y *P. rhathymum*.

## 7.2. Electroforesis bidimensional

Después de analizar la mortalidad de los organismos bajo los diferentes tratamientos se decidió considerar para los siguientes análisis a los organismos expuestos a las mayores densidades celulares ( $6,000 \text{ cel mL}^{-1}$ ) y a las menores diluciones (1:50) de cada especie de dinoflagelado. De esta forma, se prepararon 12 extractos proteicos a partir de la homogenización de 20 juveniles por muestra por triplicado, a los que se les determinó la concentración de proteínas solubles totales, presentando en promedio  $3.080 \text{ mg mL}^{-1}$ . Antes de realizar la técnica de electroforesis-2D, se hicieron corridas preliminares de isoelectroenfoco (IEF) con extractos de organismos control con el objetivo de estandarizar la técnica. Sin embargo, fue necesario encontrar un método para eliminar las sales en las

muestras proporcionadas por la concha de los organismos (Fig. 10); una vez estandarizado el método de desalinización, se llevó a cabo la electroforesis 2D en todas las muestras, obteniendo finalmente un total de 36 geles.

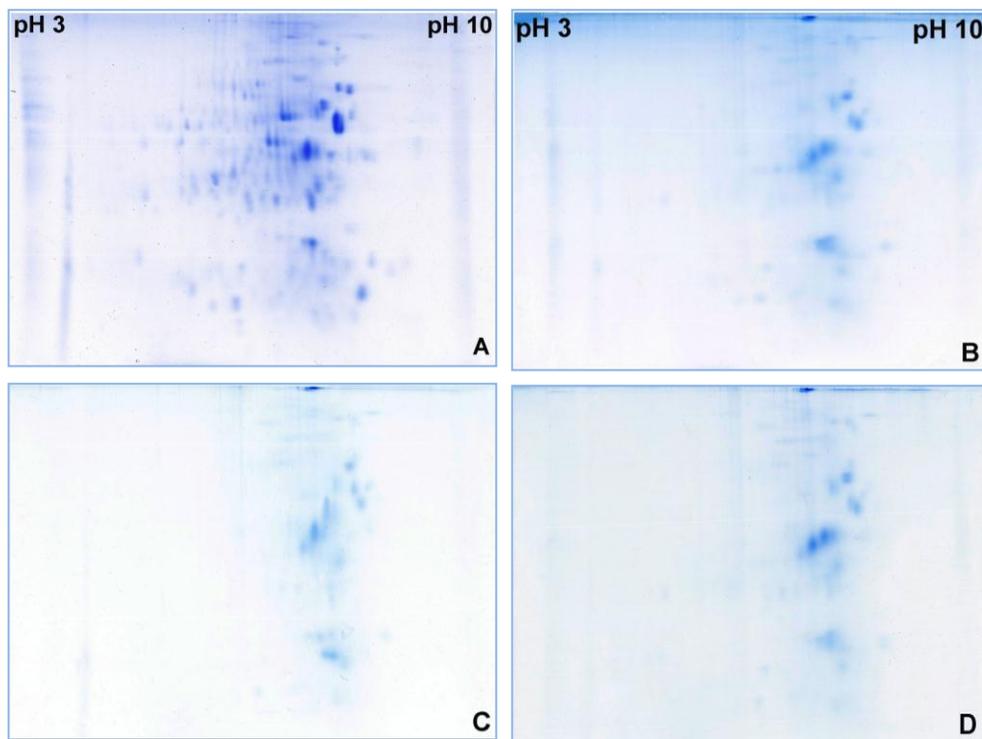


**Figura 10.** Electroforesis 2D de homogenados de juveniles *C. gigas* bajo diferentes tratamientos de desalinización: A) Sephadex G25, B) Acetona (Jurgen *et al.*, 2011) y C) ReadyPrep™ 2-D Cleanup Kit

### 7.2.1. Análisis 2D de extractos proteicos de ostiones expuestos a células completas de tres especies de dinoflagelados

A partir del análisis de las imágenes 2D obtenidas de la separación electroforética de las proteínas solubles de los organismos expuestos a células completas de *P. lima*, *P. minimum*, *P. rhathymum* con respecto al control (*Isochrysis galbana* 6,000 cel mL<sup>-1</sup>) usando el programa Melanie 7.0<sup>®</sup>, se obtuvo como resultado la detección de un total de 434 puntos de proteínas, los cuales en su mayoría fueron distribuidos dentro del rango de pH de 5-8 (Fig. 11); de estos, 64 puntos se encontraron representados entre el control y cada uno de los tratamientos.

El análisis proteómico, basado en el % volumen de los puntos realizado en cada uno de los geles (n=12), reveló cambios estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) en la expresión de 26 puntos de proteína.

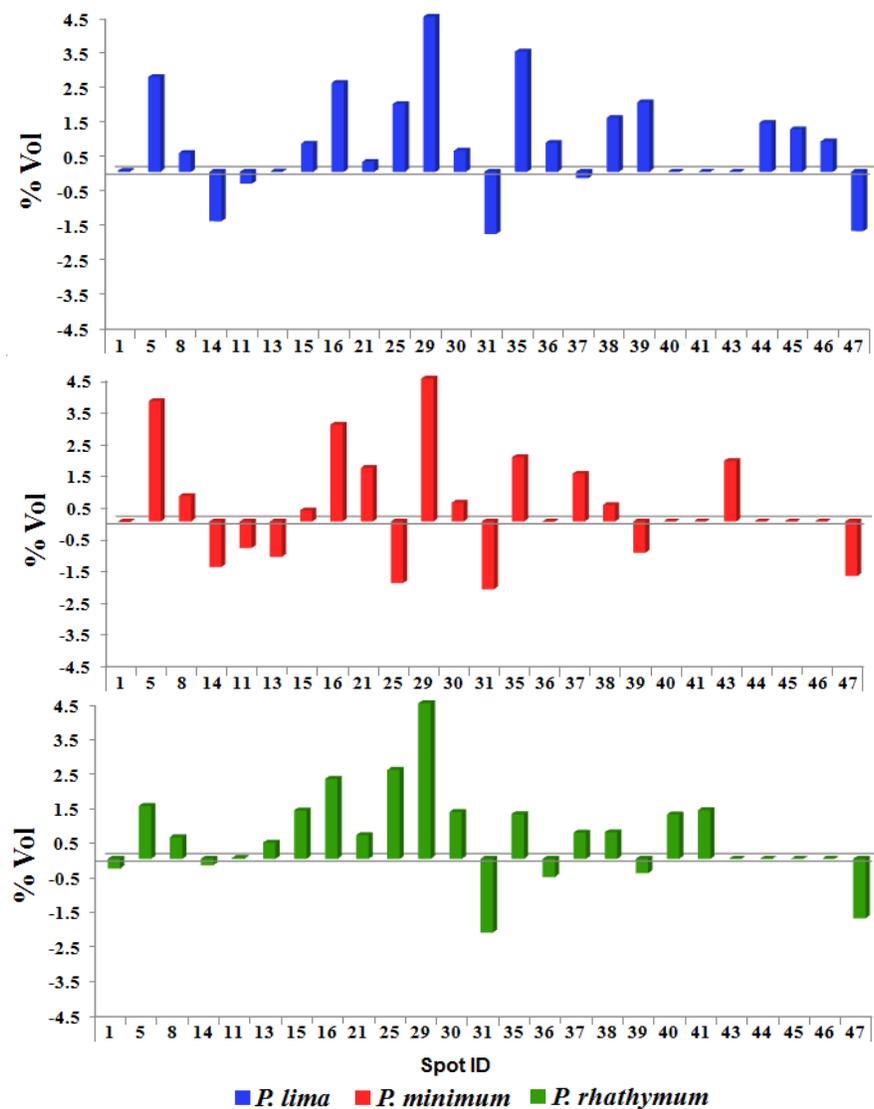


**Figura 11.** Patrón de proteínas solubles obtenido mediante electroforesis 2D de extractos de juveniles *C. gigas* expuestos a células completas ( $6,000 \text{ cel mL}^{-1}$ ) de: A) *Isochrysis galbana* B) *P. lima* C) *P. minimum* y D) *P. rhathymum*.

#### 7.2.1.1. Expresión diferencial de proteínas de juveniles de ostión *Crassostrea gigas* expuestos a células completas de dinoflagelados

Los cambios estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) observados en la expresión de los 26 puntos de proteína durante el análisis de los organismos expuestos a las células completas (Anexo 1) mostraron que existen diferentes efectos ocasionados por cada una de las cepas (Fig. 12), como el caso de *P. lima* donde se observa que 13 puntos de proteínas presentan una sobre-expresión, en tres existe una disminución de la expresión, otros dos donde la expresión fue reprimida y finalmente tres proteínas que fueron inducibles. En el caso de los organismos expuestos a *P. minimum* se observaron nueve proteínas sobre-expresadas, tres en las cuales su expresión disminuyó, cinco que fueron reguladas de forma negativa, cinco más cuya expresión fue reprimida y una en la cual su expresión fue inducida. Mientras que en los organismos expuestos a células de *P. rhathymum* se obtuvo

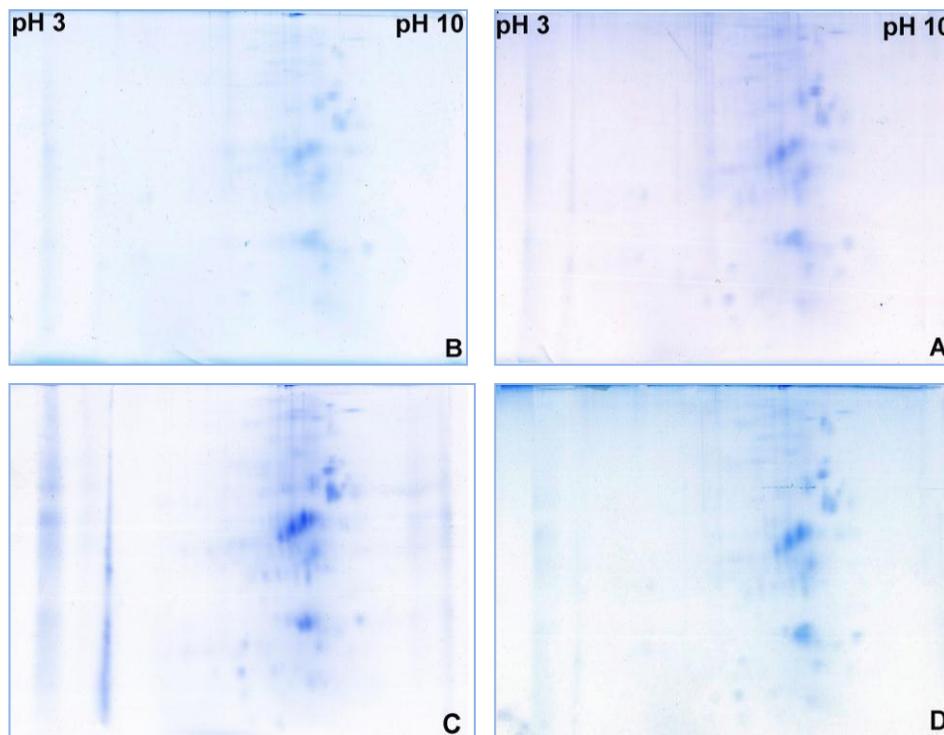
una sobreexpresión de 13 proteínas; cuatro que fueron reguladas de forma negativa, esto es disminuyendo su expresión, así como también tres más que fueron reprimidas y una en la cual la expresión fue inducible.



**Figura 12.** Expresión diferencial puntos de proteína estadísticamente significativos en *C. gigas* expuesto a células completas de tres especies de dinoflagelados, con respecto al control.

### 7.2.2. Análisis 2D de proteínas obtenidas de organismos expuestos a extractos acuosos de tres especies de dinoflagelados

En los homogenados obtenidos de organismos expuestos al extracto acuoso (1:50) se identificaron un total de 476 puntos de proteínas, distribuidas en un intervalo de pH de 6-8 (Fig. 13). Durante el análisis proteómico de los geles (n=12) se obtuvo la expresión diferencial ( $p < 0.05$ ) de siete puntos de proteína.

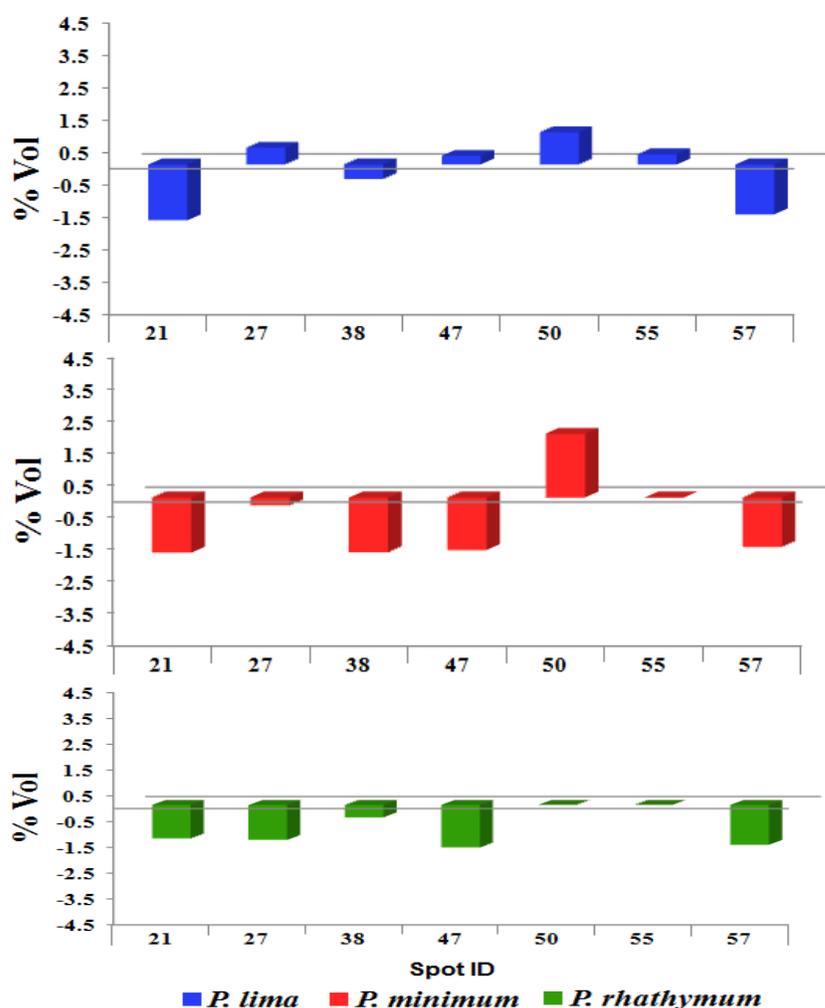


**Figura 13.** Patrón de proteínas obtenido mediante electroforesis 2D de homogenados proteicos de *C. gigas* expuestos a una dilución 1:50 de extractos acuosos de: A) agua destilada, B) *P. lima*, C) *P. minimum* y D) *P. rathymum*.

#### 7.2.2.1. Expresión diferencial de proteínas de juveniles de ostión *Crassostrea gigas* expuestos a extractos acuosos

El análisis proteómico basado en el % volumen de los puntos proteicos, realizado en cada uno de los geles, reveló cambios estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) en la

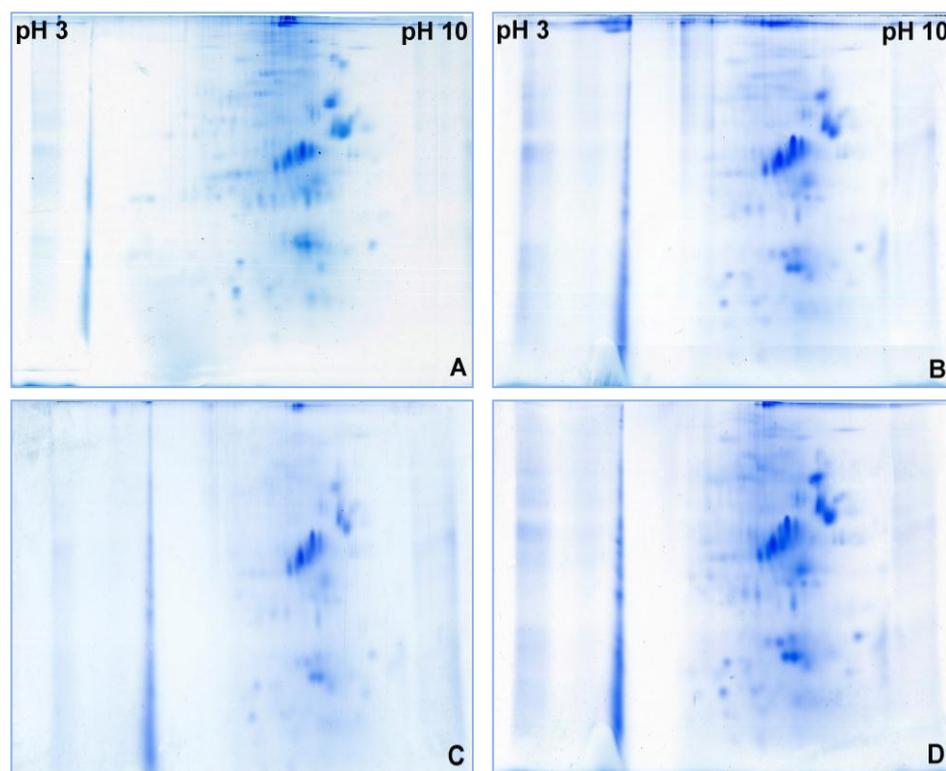
expresión de siete puntos de proteína (Fig. 14). En este caso, se observó un mayor número de proteínas cuya expresión fue reprimida, principalmente en presencia de extractos de *P. minimum* con cuatro proteínas, seguida de *P. rhathymum* y *P. lima* con dos proteínas respectivamente. Las proteínas que disminuyeron su expresión se presentaron en los organismos expuestos a *P. rhathymum* y *P. lima* con tres y una respectivamente. En el caso de las proteínas que presentaron una sobre-expresión solamente se observaron dos con *P. lima* y una con *P. minimum*. Finalmente, las proteínas inducibles se presentaron solamente en los organismos expuestos a *P. lima* (2) y *P. minimum* (1).



**Figura 14.** Expresión diferencial de puntos de proteína de *C. gigas* expuestos a extractos acuosos, estadísticamente significativos en comparación con el control.

### 7.2.3. Análisis 2D de proteínas obtenidas de ostiones expuestos a extractos orgánicos de tres especies de dinoflagelados

En *C. gigas* expuestos a extractos orgánicos (1:50) se observaron un total de 623 puntos de proteína distribuidos en un intervalo de pH de 6-8 (Fig. 15). Durante el análisis proteómico de los geles (n=12), se identificó expresión diferencial en 13 puntos de proteína.

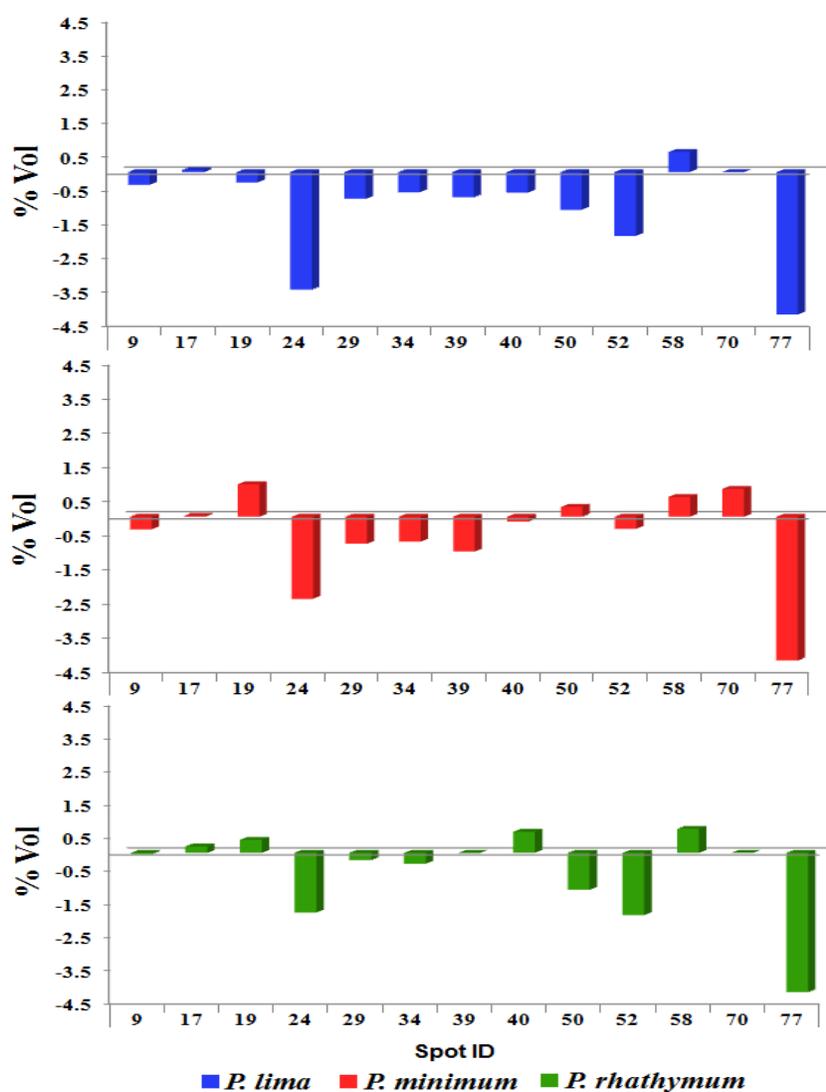


**Figura 15.** Mapa proteómico de extractos de juveniles de *C. gigas* expuestos a extractos orgánicos diluidos 1:50 de: A) Tween 60, B) *P. lima*, C) *P. minimum* y D) *P. rathymum*.

#### 7.2.3.1. Expresión diferencial de proteínas de juveniles de ostión *Crassostrea gigas* expuestos a extractos orgánicos

Durante el análisis estadístico de los puntos de proteína presentes en los geles obtenidos de organismos expuestos a extractos orgánicos 1:50, se obtuvo un total de 13 proteínas (Fig. 16) con expresión significativa ( $p < 0.05$ ). En los organismos expuestos a *P. lima* se

observó una disminución de la expresión en cuatro proteínas, mientras que en otras seis la expresión fue reprimida, y en una más se observó una sobre-expresión. En el caso del tratamiento con extracto orgánico de *P. mínimum* se observó la presencia de tres proteínas sobre-expresadas, en cinco de las cuales la expresión disminuyó, en otras tres se reprimió y en dos más la expresión fue inducible. Finalmente, en los organismos expuestos al extracto de *P. mínimum* se detectó la presencia de tres proteínas sobre-expresadas, cuatro cuya expresión fue disminuida, tres en las cuales donde su expresión fue reprimida y una mas inducible.



**Figura 16.-** Patrón de expresión de proteínas de *C. gigas* que presentaron expresión diferencial al ser expuestos a extractos orgánicos de las tres especies de dinoflagelados.

### 7.3. Proteínas seleccionadas para su identificación mediante el análisis de espectrometría de masas

Para el análisis de espectrometría de masas se seleccionaron los puntos de proteína que presentaran una expresión diferencial con respecto al control, dando prioridad a aquellas proteínas que se encontraran bien definidas y que presentaron una mayor intensidad (para minimizar la posible contaminación por otras proteínas y porque los puntos con baja intensidad no contienen la cantidad suficiente de para su análisis). Sin embargo, para solucionar este problema los puntos se recortaron cuidadosamente del gel y se mandaron secuenciar a 3 réplicas del mismo punto de proteína.

#### a) Células completas

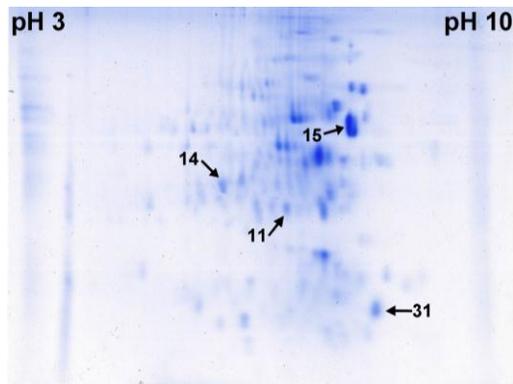
De los organismos expuestos a 6,000 células completas/mL de *P. lima*, *P. minimum* o *P. rhathymum* se seleccionaron cuatro puntos de proteínas (Tabla I), los cuales se expresaron tanto en el control como en los tratamientos.

**Tabla I.** Proteínas reguladas obtenidas de organismos expuestos a células completas (CC).

CC	# Spots			
	11	14	15	31
<i>P. lima</i>	-	-	+	-
<i>P. minimum</i>	-	-	+	-
<i>P. rhathymum</i>	-	-	+	-
<b>Control</b>	c	c	c	c

Notación: (+) sobre-expresión, (-) sub-expresión y (c) control.

Los puntos de proteínas seleccionados de los geles 2D de los extractos obtenidos de organismos expuestos a células completas se muestran en la figura 17, en donde las proteínas 11, 14 y 31 presentaron una disminución en su expresión al ser expuestos a *P. lima*, *P. minimum* y *P. rhathymum*, mientras que la proteína 15 mostró una sobre-expresión con cada una de las especies ensayadas de *Prorocentrum*.



**Figura 17.** Perfil de expresión 2D de proteínas obtenidas de *C. gigas* expuestos a *I. galbana* (control); con flechas se señalan las proteínas (11, 14, 15 y 31) que presentaron algún tipo de regulación y que fueron seleccionadas para secuenciación.

### b) Extracto acuoso

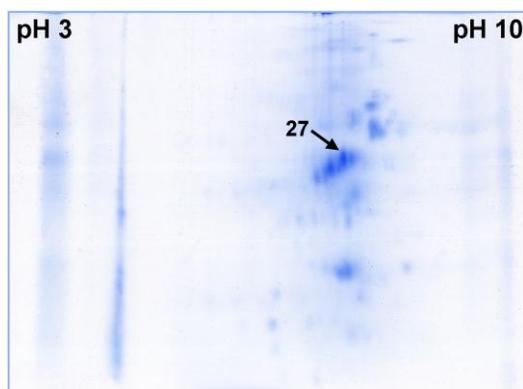
Para la identificación de los puntos de proteínas reguladas presentes en los ostiones expuestos a extractos acuosos de cada especie de *Prorocentrum*, se seleccionó un punto de proteína de los que fueron estadísticamente significativos (Tabla II), el cual se encontraba bien representado tanto en los tratamientos como en el control.

**Tabla II.** Proteínas reguladas obtenidas de organismos expuestos a extractos acuosos.

EA	# Spots
	27
<i>P. lima</i>	+
<i>P. minimum</i>	-
<i>P. rhathymum</i>	-
Control	C

Notación: (+) sobre-expresión, (-) sub-expresión y (c) control.

En la figura 18 se observa la ubicación de la proteína en el gel, en donde el punto de proteína seleccionado para el análisis corresponde al número 27, el cual disminuye su expresión durante la exposición a *P. rhathymum* y *P. minimum*, mientras que la cepa de *P. lima* causa una sobre-expresión.



**Figura 18.** Mapa proteómico de extractos de juveniles de *C. gigas* expuestos a un extracto acuoso de *P. minimum*. La flecha indica la ubicación de la proteína (27) que presentó expresión diferencial y fue extraída para su análisis.

### c) Extracto orgánico

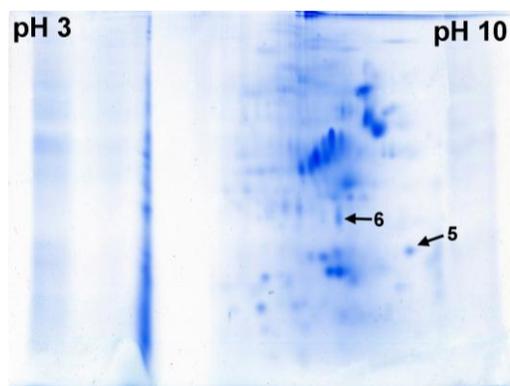
Para la identificación de las proteínas reguladas correspondientes a los organismos expuestos a extractos orgánicos de dinoflagelados, se seleccionaron dos puntos de proteína (Tabla III) para su análisis.

**Tabla III.** Proteínas reguladas obtenidas de organismos expuestos a extractos orgánicos.

EO	# Spots	
	17	58
<i>P. lima</i>	+	+
<i>P. minimum</i>	+	+
<i>P. rhathymum</i>	+	+
<b>Control</b>	c	-

Notación: (+) sobre-expresión, (-) sub-expresión y (c) control.

La ubicación de las proteínas seleccionadas en el gel se muestra en la figura 19, en donde la exposición a los extractos orgánicos de cada una de las especies de dinoflagelados *P. lima*, *P. rhathymum* y *P. minimum* ocasionó una sobreexpresión en el punto de proteína 17; mientras que el punto de proteína 58 fue reprimido en control, observándose una proteína inducible en cada uno de los tratamientos.



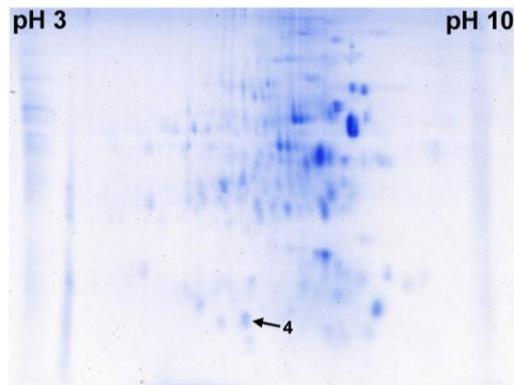
**Figura 19.** Mapa proteómico de extractos de juveniles de *C. gigas* expuestos a extractos orgánicos (control). En flechas se marcan las proteínas (17 y 58) que presentaron expresión diferencial y fueron extraídas para su análisis.

#### d) Proteína constitutiva

Debido a que durante el análisis de cada uno de los tratamientos con su respectivo control se observó la presencia de una proteína (04) que mantuvo constantes sus niveles de expresión independientemente del tratamiento o control (Tabla IV), se decidió aislarla y mandarla a secuenciar. La ubicación de esta proteína en cada gele puede observarse en la figura 20.

Tabla IV. Valores en % Volumen de los puntos de proteína que mantuvieron su expresión estable tanto en los organismos expuestos a las células completas, extractos acuosos y orgánicos de las especies de dinoflagelados: *P. lima*, *P. minimum* y *P. rhathymum*.

Tratamiento	# Spot	Control	<i>P. lima</i>	<i>P. minimum</i>	<i>P. rhathymum</i>
CC	04	0.762	0.760	0.767	0.755
EA	10	0.742	0.745	0.741	0.751
EO	10	0.756	0.748	0.755	0.758



**Figura 20-** Mapa proteómico de extractos de juveniles de *C. gigas* expuestos a *I. galbana* (control). La flecha indica la ubicación de la proteína constitutiva (4) en cada uno de los geles.

#### **7.4. Identificación de proteínas**

Como se ha mencionado, los puntos de proteína seleccionados para su identificación fueron aislados manualmente de los geles 2D, generando un total de ocho muestras de proteína: cuatro correspondientes a los extractos de organismos expuestos a células completas, dos a extractos orgánicos, uno a extractos acuosos y uno cuya expresión fue constante (constitutiva) en cada uno de los experimentos y sus controles.

##### **7.4.1. Proteínas obtenidas bajo exposición a células completas**

En el caso de los organismos expuestos a células completas se mandaron secuenciar cuatro puntos de proteína, encontrándose que cada uno de los puntos peptídicos correspondió a diferentes proteínas, por lo que en total se identificaron siete proteínas.

Con las secuencias de péptidos obtenidas en el punto 11 se identificaron dos proteínas (péptidos marcados en rojo), la primera se identificó como *Proteína Toll de interacción* y la segunda como *Dihidropteridina reductasa*, cuyas secuencias se muestran a continuación:

Proteína Toll de interacción (GI:405969505).

```
1   mattntetaq ngqnrraaqvm igelpgdflr vsynqqqqmm aderiaqilq aqqqagfmhp
61  vpaniqgrls lsvvqaklak nygltkmdpy vririghsvi etptayngak nprwnkdinl
121 ylphgvesmy leifderqft mddriawayi tipqsvlmgd tmnewfplsg rggdekegmi
181 nlvmslsvvt qrqpslpnng nlphkpvvyf lqqtvpqppa gmpayppqtv gspqtqrplf
241 teddlkqvkd mfpnmedevv rsvleanrgn kdatinsllq mnsd
```

Dihidropteridina reductasa (GI:5946263).

```
1   mscagriliy ggkgalgssc vslfksknyw vgsidlmpne qadanvvpkp seswlnqede
61  vlkgvesiig gekldavlc v aggwaggnaa skefiknadm mwkqsvwtss iaaalaakyl
121 keggiitlpg aapcvggtag mmgygmaaa vhqlvksslas kgsglpanss availpvtld
181 tpmnrkfmse adfttwtple fvaelffkwt sdgstrpeng slvklvtkeg ntalqnv
```

Con el punto 14 se identificaron tres proteínas (*Proteína secretora rica en cisteína LCCL dominio 2*, *Periostina* y *Catepsina L*), las secuencias y los péptidos (en rojo) se muestran a continuación:

Proteína secretora rica en cisteína LCCL dominio 2 (GI:405965644).

```
1   mfglliaafl vtttvngesv aigqykqql dvhnayrgmq gaadmhalvw ddqlsseaan
61  wikscfheq mkgrgenlaf dtnpkkdeel inssmkawyd eikdynyark qcgrschytq
121 ivwaktrkvg caiekcdylh gfgrpikdaw ylacfydpkg nyiseypytk gpacskclqk
181 qscentlctg egvevcenld ddceywssag ecqsnpnfml kkcrkacgvc gglfvhveip
241 iqlkqmgvvn gayralgina lclctgdksy lvkcrlnksk rvlmqhhkas vllspksnt
301 visrpelltl rlyetehtfg dlhremdsal saecqlsps
```

Periostina (GI:405970465).

```
1   mkailplcli gfalcqegni vqvakklgat tlléfateag ladtlatgpp ftvfaptnea
61  faklppkvve flkknkealq evlkfhvlsq ktyssqlkne lvvqtlqpk svriniyqng
121 kvitadgspv vladqnatng vihvinrvef pipvmdvvkt aerlselgtl vkavvaaglg
181 ntlsgpppft vfaptdqafa alppgtldnl lknktaltdv ltyhvvsgty fssgltsjav
241 ptvegksvni vvgqgvkvng anvvdadeav tngvihiidk vlippsft
```

Catepsina L (GI:405958751).

```
1   mlrvavvaal vavcfarlpk seldsewqly lkahgkqyga eeearrvviw egnldyiekh
61  nlaadrgdys fwlgmneygd mtneefrstm ngykmrngts rgslylppsn igdlpdtvdw
121 rpkyvtpik nqqqcgscws fsatgslegq tfkktgklps lseqnlvdcs qkqgnhgccg
181 glmddafqyi kdnngidtes sypyeakngk crfnaanvga tdsgftdik skesdlqsav
241 atvgpiavai dashmsfqly ksgvyheffc setrldhgv1 avgygtesgk dywlvknsww
301 eswgqkgyim msrnkrnncg iatsasyptv
```

Para el punto de proteína 15 se identificó solamente una proteína que fue identificada como ***Tropomiosina***.

Tropomiosina (GI:219806594).

```
1   mdsikkkmia mkmekenaqd raeqleqqlr dteeqkakie edltslqkkh snlenefdtv
61  nekygecqtk leeaekttase aegeiqslnr riqlleedme rseerlqtat ekleeaskaa
121 desernrkvl enlnnaseer tdvlekqlte akliaseeadk kydeaarkla itevdlerae
181 arleaaeakv yeleeqlsvv anniktlqvq ndqasqreds yeetirdltq rlkdaenrat
241 eaertvsklq kevdrledel laekerykai sdeldqtfae lagy
```

En el caso del punto de proteína 31 la única proteína fue identificada como ***cadena ligera esencial de miosina***.

Miosina (GI:40642994).

```
1   nkmsklskee ieeakevfel fdfwdgrdae vdaskigdvi rcvglnptle ivrknggtdk
61  mgeksykfee flpihetimn tleggtfady meafktdre gqgyisgael rhllsslger
121 ltddqvdeii rntdlqedle gnvkyeefik kvmagpypd
```

Las proteínas identificadas en cada uno de los puntos de proteína correspondientes a los organismos expuestos a células completas se muestran en la tabla V, en donde también se presentan algunas características como, el número de aminoácidos, peso molecular, punto isoeléctrico y número de acceso en la base de datos.

**Tabla V.** Lista de proteínas identificadas de los extractos de proteínas solubles obtenidas de ostiones expuestos a células completas en la que se muestran sus principales características y el efecto observado en la expresión de cada una, como respuesta a la exposición a diferentes especies de dinoflagelados.

# proteína	Identidad de la proteína	C <sup>1</sup>	# <sup>2</sup> AAs	PM <sup>3</sup> [kDa]	pI <sup>4</sup>	NP <sup>5</sup>	# ID <sup>6</sup>	Tipo de expresión <sup>7</sup>		
								<i>P.</i> <i>lima</i>	<i>P.</i> <i>minimum</i>	<i>P.</i> <i>rathymum</i>
<b>Spot 11</b>	Proteína Toll de interacción	9.86	284	32.013	5.922	2	GI:405969505	-	-	+
	Dihidropteridina reductasa	17.72	237	24.857	7.049	2	GI:405946263	-	-	+
<b>Spot 14</b>	Proteína secretora rica en cisteína LCCL dominio 2	15.04	339	38.147	7.605	4	GI:405965644	-	-	-
	Periostina	8.33	288	30.235	7.430	2	GI:405970465	-	-	-
	Catepsina L	9.39	330	36.510	6.536	2	GI:405958751	-	-	-
<b>Spot 15</b>	Tropomiosina	64.79	284	33.002	4.614	14	GI:219806594	+	+	+
<b>Spot 31</b>	Cadena ligera esencial de miosina	35.85	159	18.216	4.602	5	GI:40642994	-	-	-

Notas: <sup>(1)</sup>Cobertura de la secuencia de la proteína, <sup>(2)</sup>Número de aminoácidos en la proteína, <sup>(3)</sup>Peso molecular teórico. <sup>(4)</sup>Punto isoelectrico teórico. <sup>(5)</sup>Número de péptidos identificados en la proteína. <sup>(6)</sup>Número de acceso en la base de datos NCBI. <sup>(7)</sup>Indica la expresión de la proteína + sobre-expresión, - sub-expresión.

## 7.4.2. Proteínas obtenidas bajo exposición a extractos acuosos

En los organismos expuestos a extractos acuosos solamente se seleccionó un punto de proteína a partir del cual se identificaron 4 posibles proteínas: *actina citoplasmática*, *cavotrina*, *proteína disulfuro isomerasa* y *hidroxiantranilato dioxigenasa*.

### Actina, citoplasmática (GI:405964580)

```
1   mgeedvaalv idngsgmcka gfagddapra vfpsivgrpr hqgvvmvgmq kdsyvgdeaq
61  skrgiltlky piehgivtnw ddmekiwhht fynelrvape ehpvllteap lnpkandrekm
121 tqimfetfns pamyvaiqav lslyasgrtt givldsgdgv shtvpiyegy alphaimrld
181 lagrdltdyl mkiltergys ftttaereiv rdikeklcyv aldfeqemgt aasssleks
241 yelpdgqvit ignerfrcpe avfqpsflgm essgihetty nsimkcdvdi rkdllyantvl
301 sggstmypgi adrmqkeita lapstmkiki iapperkysv wiggsilasl stfqqmwise
361 qeydesgpsi vhrkcf
```

### Cavortina (GI:30039400)

```
1   tasneanvni ylhlsddeds nyensmhyaq cemepnafmp gnlhhrvhgs iemhqrqgdgp
61  lemsfclsgf nvsedfadhn hglqiheygd mehgcdtige lyhnehapnh dnpqdlgdlh
121 dddhgnvdat rtfdwltigh tdgilgrsla ilqgdhtsht aviaccvigr shah
```

### Proteín disulfuro isomerasa A6 (GI:405951637)

```
1   miplailava lssasalyss sddvleltps nfnkevtmyd glvfvefyap wcghcqslap
61  ewkkaataalk gvvkiaavna dehqslggqy qiqqfptikv fganknspsd yqggrtadai
121 vdtalsklks lvqdrkgrg gssgrsggsg gksgggsadd vveltdsnfe rlvlldsddmw
181 lveffapwgc hcknlaphwq saasemkgkv kfgaldatvh svmanrygvr gyptikmfpa
241 gkkdgdamey dggrtssdiv nwateklaen lpppkvvqiv sqdtiktnce ekqlcvvavl
301 phildcqskc rndyiqilkd lstkykkqpw gwvwseagqg meleaalgig gfgypamaav
361 ntrkqvvyll kgpfskgin eylrdlsygk gapiplkdtk ianiektepw dgkdgelpve
421 ddidlsdidl ddgkdel
```

### 3-Hidroxiantranilato 3,4-Dioxigenasa (GI:405955617)

```
1   madvskpvvy nrekwleenq kfflppvcnk mmhndgqvks ffvggpnqrk dyhieegeel
61  fymlkgdmcl kvveqgkhrd vpikqgeifl lpariahspq rqadtvglvi ereraenemd
121 glryyteeng ektlnslyee wfhcedlgtq lgpiikrffa seqcktgkpvt pgtipenppi
181 vldskkslqd pfnlhtfids krqdleekgr vnffgdnsqf qvdlygkgsn lgqvegaetf
241 iwqiegtasv tvegqeyklg padimlvrag qkyeatrpsg sialicyqda trkaklfpsn
```

**Tabla VI.** Lista de proteínas identificadas de los extractos de proteínas solubles obtenidos de ostiones expuestos a extractos acuosos, en la que se muestran sus principales características y el efecto observado en la expresión de cada una, como respuesta a la exposición a diferentes especies de dinoflagelados.

# proteína	Identidad de la proteína	C <sup>1</sup>	# <sup>2</sup> AAs	PM <sup>3</sup> [kDa]	pI <sup>4</sup>	NP <sup>5</sup>	# ID <sup>6</sup>	Tipo de expresión		
								<i>P. lima</i>	<i>P. minimum</i>	<i>P. rhathymum</i>
<b>Spot 27</b>	Actina citoplasmática	34.30	376	41.724	5.478	8	GI:405964580			
	Cavortina	22.41	174	19.275	5.0335	2	GI:30039400			
	Disulfuro isomerasa A6	9.61	437	47.443	5.312	3	GI:405951637	+	-	-
	Hidroxiantranilato dioxigenasa.	11.67	300	34.111	5.604	2	GI:405955617			

Notas: <sup>(1)</sup>Cobertura de la secuencia de la proteína, <sup>(2)</sup>Número de aminoácidos en la proteína, <sup>(3)</sup>Peso molecular teórico. <sup>(4)</sup>Punto isoelectrico teórico. <sup>(5)</sup>Número de péptidos identificados en la proteína. <sup>(6)</sup>Número de acceso en la base de datos NCBI. <sup>(7)</sup>Indica la expresión de la proteína + sobre-expresión, - sub-expresión.

En la tabla VI se presenta el punto de proteína 27, con cada una de las proteínas identificadas de los organismos expuestos a extractos acuosos, así también se muestran características teóricas de cada una de ellas como, el número de aminoácidos, peso molecular, punto isoeléctrico, número de acceso en la base de datos y el efecto ocasionado por la exposición a los extractos de cada una de las cepas de dinoflagelado.

### 7.4.3. Proteínas identificadas bajo exposición a extractos orgánicos

De las diversas secuencias de péptidos obtenidas de cada uno de los puntos de proteína de los organismos expuestos a extractos orgánicos se identificaron cinco proteínas (*Troponina C*, *Proteína 1 relacionada con la ependimina de mamíferos*, *Proteína citoplasmática no neuronal de filamentos intermedios*, *Isoforma 2 de la proteína-quinasa dependiente de calcio* y *Helicasa del ARN-spliceosoma*) cuyos códigos de acceso y secuencias completas se muestran a continuación:

El punto de proteína 11 fue identificado como Troponina C (GI:405970776).

```
1  msrrwvcgks ptegilqgtp gldcvlfatn ikllsnvkyp eaffhncqtg ttiinwrhgr
61  ekrqdirnkm sefkisekql tdahntfnlf dkkgdgrvst kelekvfksl alqindeqlk
121 ewademdeea egyltwdqfk vlferkirmd ederelreaf rvlkgnkgt ipvedlrwil
181 ksigddftee elddmiaetd tdgsgtvdye efkltlmtsd
```

En el caso del punto de proteína 58 con los péptidos obtenidos se lograron identificar cuatro posibles proteínas:

Proteína 1 de *C. gigas* relacionada con la ependimina de mamíferos. (GI:405968755)

```
1  mllyrlsgmf svvlisasly rvdaqlskpc espkwegnv ytvdtktnim rrvrvvyden
61  aprvritedi signqvdfyd vvylnhveyr lnktrqcnv taltrpfrqf gvphdanfig
121 katigiagip genvvienyn gqfrdgtkylf gdvtypdcip vsrgvyyesg lsldrlytsgv
181 iyfmatsses pkqwegkvit vdrkenffra grisydeyap rfriieeeeav gkqvdydyvl
241 ylnhvqkeyr lnktrqcnv taltrpfrpf gvppmanftg eatigaagia genvvienfn
301 gqftdgtkff gdvtypdcip vsngffnndi gfamntffdi nigtdpmvf ipprecagk
```

### Proteína citoplasmática de filamentos intermedios no neuronal (GI:405950795)

1 mssdkveyrr svktapvvss rttviqrtpa gsgnvmnrss tsrlsmgpaf stgvlaglsh  
61 kgvndviqtr drekkdmqgl nerfasyiek vrfleaqnka llaeidrkk lkgfdvseik  
121 elyeqeiaes **rnvidelske kakfdstlvq** lqdaldekr **erlasekeca elrnkldrln**  
181 **dqigeyegei atlrgriggl edevskqrat** nkrlqddiar lradldeetr kriaeackaq  
241 **aveedltfrl** nvadaeikel qalidrckgv emrdiwkgem skavnelqke ydnqinqirl  
301 dcesrmesql relqagvnr nmeaqakee trklksrmgd igprlaelea enaklrnqii  
361 alesemsdmq rehdrendkn aerisglens leevirelqv lqdaklslel eiscyrkllle  
421 teenslkniv enssgarskg anqladivqk ssssssysyg sryneessgq qysntslsst  
481 ggsnygqpd l rssestgklt vhrscrgnia fsdaapdgsq vgienntsgv kgktvnlkgw  
541 kirreiggkt kctyefkndl qlgpgqkikl fsggaadmkn sdsdivcdf twhagggssy  
601 ltdeynneka slkmtitn

### Isoforma 2 de proteína-quinasa dependiente de Calcio (GI:405974628)

1 mfawyfhyva kafcssmadf skwaqkhlsr **vgedfeevdk dksgsldff** **vynvlqksgf**  
61 kgtleeakri **fqsldvdkne kiskdeyvk** makvpkidfk qivlrrafnk ldkdgsfll  
121 rdeildaasn eaeldasaen isdlliylvt dddkkidyee flkiwnvkt ssamrtlfqk  
181 ldt dgsgkvd rkellldglqg dselhlqapk iseilikwsk **nhtgplsye** **flkayesv**

### Helicasa del ARN-spliceosoma de *C. gigas* (GI:405952464)

1 madnenetel ldyedetet tadgtgdapv kkdvkgtys ihssgfrdfl lkpellraiv  
61 dcfefhpsev qhecipqail smdvlcqaks gmghtavfvl atlqlepv d gqsvl vlah  
121 trelafqisk eyerfskymn nvkiavffgg msikkdedvl kknpcphiivg tprilalch  
181 skvlnlknvk hfvldecdkm laaldmrrdv qeifrntphe kvmmfsatl skeiravckr  
241 fmqdpmevyv ddskltlhg lqqhyvklkd neknrklfel ldvlefnqvi ifvksvqrcm  
301 alaqlveqn fpaiaihram tqeerlsryq qfkdfqkri **vatnlfgrgm** diervnivfn  
361 ydmpedsdty lhrvaragrft **gkglaitfv sdetdakvln** evqerfevni telpdeidis  
421 syiiynplr rgvdkeyggv dsticssrvf rfgngrnllt keiskvytad ndvadtrcrl  
481 dvnvgk

Las proteínas identificadas en cada uno de los puntos de proteína correspondientes a los organismos expuestos a extractos orgánicos se muestran en la tabla VII, en donde también se presentan algunas características teóricas de cada una de ellas como, el número de aminoácidos, peso molecular, punto isoeléctrico, número de acceso en la base de datos y el efecto ocasionado por la exposición a los extractos acuosos de cada una de las especies de dinoflagelado.

**Tabla VII.** Lista de proteínas identificadas de los extractos de proteínas solubles obtenidos de ostiones expuestos a extractos orgánicos, en la que se muestran sus principales características y el efecto observado en la expresión de cada una, como respuesta a la exposición a diferentes especies de dinoflagelados.

# proteína	Identidad de la proteína	C <sup>1</sup>	# <sup>2</sup> AAs	PM <sup>3</sup> [kDa]	pI <sup>4</sup>	NP <sup>5</sup>	# ID <sup>6</sup>	Tipo de expresión <sup>7</sup>		
								<i>P.</i> <i>lima</i>	<i>P.</i> <i>minimum</i>	<i>P.</i> <i>rhathymum</i>
<b>Spot 17</b>	Troponina C	11.87	219	25.634	4.906	45.835	GI:405970776	+	+	+
	Proteína 1 de <i>C. gigas</i> relacionada con la ependimina de mamíferos.	11.42	359	40.505	6.074	175.484	GI:405968755			
<b>Spot 58</b>	Proteína citoplasmática no neuronal de filamentos intermedios	11	618	69.245	5.4785	84.779	GI:405950795	+	+	+
	Isoforma 2 de proteína-quinasa dependiente de Ca	21.85	238	27.286	5.274	40.776	GI:405974628			
	Helicasa del ARN-spliceosoma	4.94	486	55.370	5.884	12.279	GI:405952464			

Notas: <sup>(1)</sup>Cobertura de la secuencia de la proteína, <sup>(2)</sup>Número de aminoácidos en la proteína, <sup>(3)</sup>Peso molecular teórico. <sup>(4)</sup>Punto isoelectrico teórico. <sup>(5)</sup>Número de péptidos identificados en la proteína. <sup>(6)</sup>Número de acceso en la base de datos NCBI. <sup>(7)</sup>Indica la expresión de la proteína + sobre-expresión, - sub-expresión.

#### 7.4.4. Proteína constitutiva

En el caso de la proteína cuya expresión fue constante en cada uno de los experimentos y sus controles, no fue posible identificarla.

### 8. Discusión

#### 8.1. Efecto de *P. lima*, *P. minimum* y *P. rhathymum* en juveniles de *C. gigas*

El reciente aumento de las FAN en los sistemas acuáticos ha cobrado una connotación alarmante debido al aparente incremento de su frecuencia, intensidad y distribución geográfica (Moreno *et al.*, 2004; Hernández-Orozco y Gárate-Lizárraga, 2006), y al hecho de que entre el 50-75% de las proliferaciones algales analizadas hasta la fecha han sido tóxicas. El género *Prorocentrum* es uno de los más importantes entre los dinoflagelados tóxicos por el gran número y abundancia de especies productoras de toxinas (Delgado *et al.*, 2002). Algunas especies de este género son frecuentes en zonas costeras y están ampliamente distribuidas a lo largo del Pacífico y el Golfo de California (Wikfors y Smolowitz, 1995), lo que implica una alta probabilidad de que estos organismos sean ingeridos por *C. gigas* afectando su crecimiento y supervivencia. Sin embargo, pocos son los estudios que han evaluado este tipo de efectos, principalmente en organismos jóvenes: semillas (juveniles de 5-7 mm) y juveniles. Dentro de estos estudios encontramos el llevado a cabo por Pearce *et al.* (2005), quienes realizaron bioensayos con *C. gigas* de 4 mm exponiéndolos durante 21 días a una dieta de *P. rhathymum* bajo condiciones que simulaban una proliferación ( $10^4$  cel mL<sup>-1</sup>), no observándose mortalidad. Estos resultados difieren de los obtenidos en la presente investigación, ya que se observó una mortalidad del 80% de los juveniles de *C. gigas* al ser expuestos a  $6 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> de *P. rhathymum*, con una relación directa entre el número de células del dinoflagelado y la mortalidad, relación que concuerda con los resultados obtenidos por de las Heras (2009) al exponer a *C. gigas* (3-5 mm) a esta especie de dinoflagelados. Sin embargo, de las Heras registró una mortalidad del 100% en organismos expuestos a  $4.8 \times 10^3$  y  $6 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> y en aquellos expuestos a los extractos más concentrados (1:50) de las tres especies de dinoflagelados

estudiadas después de 65 h de exposición, observándose la mayor mortalidad ante *P. lima*. En el presente estudio se observó una mortalidad de 83.33% de mortalidad (el máximo porcentaje máximo registrado) se obtuvo con *P. rhathymum*, seguido por *P. lima* y finalmente *P. minimum* (Fig. 7), observando en ambos experimentos un efecto directo y diferencias significativas en la mortalidad de los ostiones en relación a la especie de dinoflagelado y el tiempo de exposición. Las diferencias de mortalidad entre el trabajo realizado por de las Heras (2009) y los resultados del presente estudio pueden explicarse a través del análisis de los organismos utilizados. En este trabajo los organismos usados en los bioensayos fueron ligeramente más grandes (5-7 mm) lo que les confiere indirectamente mayor resistencia ante este tipo de exposición al disminuir la proporción masa/masa (dinoflagelado/ostión) o volumen/masa (extracto/ostión), lo que tiene finalmente un efecto de dilución. Aunado a esto, tenemos que los efectos potenciales de diferentes especies de algas nocivas y sus toxinas pueden variar en los bivalvos dependiendo de una serie de respuestas especie-específicas o individuales (Landsberg, 2002).

El comportamiento de alimentación de los bivalvos puede ser uno de los principales factores que controlan inicialmente y limitan el grado en que las toxinas son ingeridas, esto debido a que algunos de ellos pueden responder inmediatamente para evitar el consumo de dinoflagelados tóxicos (Landsberg, 2002). Este caso se presentó en los organismos expuestos a células completas, en los que se observó que los ostiones alimentados con *P. lima* cerraron las valvas (como mecanismo de defensa) y posteriormente redujeron la tasa de filtración produciendo pseudo-heces, que se reflejó en la calidad del agua. De igual forma, en los organismos expuestos a *P. rhathymum* se observó reducción en la tasa de filtración y formación de pseudo-heces, pero en menor proporción, mientras que los organismos expuestos a *P. minimum* filtraron todo, no observándose la formación de pseudo-heces. Este comportamiento coincide con las observaciones de Landsberg (2002) quien menciona que la alimentación de los bivalvos filtradores exhibe diversas respuestas de comportamiento cuando se exponen a proliferaciones algales tóxicas, dichas respuestas pueden estar relacionadas a la toxicidad relativa de los compuestos producidos por las microalgas. Esto pudo observarse en los organismos expuestos a *P. lima* quienes

presentaron una mayor respuesta, comportamiento que de acuerdo a de las Heras (2009) sugiere que las toxinas producidas por *P. lima* son más “potentes”, lo que genera reacciones inmediatas por parte de los ostiones. La toxicidad de *P. lima* ha sido comprobada por Heredia-Tapia *et al.* (2002) al analizar el perfil de toxinas de *P. lima* PRL-1 (cepa usada en este estudio y por de las Heras, 2009) aislada de la Isla El Pardito en el Golfo de California. Los autores encontraron una proporción 2:1 de dinophysitoxina: ácido okadaico, estimando mediante bioensayo en ratón un contenido total de toxinas (basado en la toxicidad del AO) de 19 pg cel<sup>-1</sup>. Bricelj y Shumway (1998) establecen que los efectos observados en los organismos dependen de factores como: la densidad celular, la duración de la exposición, la toxicidad y, en ambientes naturales, la abundancia relativa de las especies de fitoplancton.

Los moluscos bivalvos son organismos filtradores que se alimentan de partículas en suspensión, cuya capacidad para clasificar y seleccionar las partículas capturadas ha sido ampliamente estudiada (Taghon, 1982; Newell y Jordan, 1983; Jorgensen, 1996; Defossez y Hawkins, 1997; Ward, 1996; Ward *et al.*, 1998; 2003; Cognie *et al.*, 2003; Beninger *et al.*, 2004; Dutertre *et al.*, 2007; Pales-Espinoza *et al.*, 2009, 2010a, 2010b). Las principales características que se ha identificado que participan en este fenómeno son la forma, las propiedades químicas y/o bioquímicas y el tamaño de las partículas. Estas características juegan un papel muy importante en el presente estudio, principalmente en los organismos alimentados con células completas, debido a que las larvas de *C. gigas* se alimentan primordialmente de especies de fitoplancton con células menores a 5 µm, mientras que de acuerdo a Blanchard *et al.* (2008) las células más grandes son ingeridas en tasas más bajas o moderadas. El tamaño de las células de las especies empleadas en este trabajo es de: 32-50 µm de longitud y 20-28 µm de ancho en *P. lima*, 18-20 µm de longitud y de 15-16 µm de ancho en *P. minimum* (Dodge, 1982) y de 31-36 µm de longitud y 17-21 µm de ancho en *P. rhathymum* (Hernández-Becerril *et al.*, 2000), lo cual puede ser una de las causas probables de la formación de pseudo-heces observada especialmente en los organismos alimentados con *P. lima* y *P. rhathymum*, ya que al ser células de mayor tamaño son rechazadas por las branquias y palpos labiales, o bien son recubiertas de *mucus* para posteriormente ser eliminadas de la cámara inhalante en forma de pseudo-heces.

Otra de las características importantes para la selección del alimento de *C. gigas* son las propiedades químicas y/o bioquímicas, ya que las biotoxinas marinas son compuestos no proteicos con estructuras diversas, cuyos pesos moleculares se encuentran entre 250-3500 Da. Sus propiedades físico-químicas varían de acuerdo con su polaridad, la naturaleza lipofílica, estabilidad térmica, sensibilidad al pH, el oxígeno, la luz, etc. (Riobó *et al.*, 2012). Muchos estudios sugieren que los moluscos bivalvos usan señales químicas para discriminar entre partículas (Newell y Jordan, 1983; Ward y Targett, 1989; Pales Espinosa *et al.*, 2007, 2009, 2010a, 2010b). Esta conducta fue inicialmente demostrada en *M. edulis* por Ward y Targett (1989), quienes demostraron que este organismo es capaz de seleccionar, e ingerir preferentemente microesferas sintéticas recubiertas con metabolitos producidos por especies de microalgas. De la misma forma, en estudios realizados en *C. gigas* se ha demostrado que estos organismos son capaces de ingerir selectivamente microcápsulas de alginato que contienen células vivas de microalgas, o bien rechazarlas en forma de pseudo-heces dependiendo la especie, lo que sugiere que las células de microalgas producen metabolitos extracelulares que juegan un papel crucial en la selección pre-ingestiva de las partículas y que son reconocidas específicamente por los bivalvos (Pales-Espinosa *et al.*, 2007). Este mecanismo podría estar relacionado con el comportamiento observado en los juveniles de *C. gigas* expuestos a *P. lima*, ya que Rausch de Traubenberg y Morlaix (1995) reportaron que esta especie (*P. lima*) produce exotoxinas.

Actualmente, se ha dado un nuevo enfoque a la participación de las señales químicas de las microalgas en la preselección de las partículas de alimentos por *C. gigas*. Se sugiere un mecanismo de reconocimiento mediado por lectinas del *mucus* (que cubre los órganos de alimentación) a través de interacciones específicas entre los carbohidratos en la superficie de las partículas (alimento) y las lectinas que intervienen en los procesos de selección y rechazo (Pales-Espinoza *et al.*, 2009, 2010a, 2010b). Si bien, algunos aspectos del proceso de selección se han dilucidado, el mecanismo real por el que las partículas de mala calidad son rechazadas y las de mejor calidad se desvían hacia la boca y se ingieren, sigue siendo aún incierto.

## 8.2. Análisis de las proteínas

Las proteínas son esenciales para diversos procesos celulares, incluyendo la provisión de la estructura, el transporte de moléculas a través de las membranas, el control del crecimiento, la adhesión, y en los procesos bioquímicos al funcionar como enzimas y regulando la transducción de señales (Wu y Singh, 2011). La caracterización de la cantidad y actividad de las proteínas es un punto crítico para la comprensión de los mecanismos moleculares de procesos celulares que incluyen los implicados en la progresión de enfermedades y la diferenciación celular, para el descubrimiento y desarrollo específico de nuevos productos terapéuticos, vacunas y para el diagnóstico (Wu y Singh, 2011).

### 8.2.1. Efecto de la exposición de juveniles de *C. gigas* a células completas de tres especies del género *Prorocentrum*

En este trabajo, el análisis 2-DE reveló cambios estadísticamente significativos en la expresión de los 26 puntos de proteína bajo las condiciones experimentales ensayadas (Fig. 12, anexo 1). En general, se observó una fuerte represión de la expresión (comparado con el control Fig. 11A) en los organismos tratados con los dinoflagelados (Fig. 11 B-D), sin embargo, hay cambios más finos que son especie-dependientes (Fig. 11). Por ejemplo, con *P. lima* 13 puntos de proteínas presentaron sobre-expresión, tres represión y tres más fueron inducidas. Con *P. minimum* se sobre-expresaron nueve, cinco fueron reprimidas y sólo una inducida. Finalmente con *P. rathymum* se sobre-expresaron de 13, tres se reprimieron y la expresión de una proteína más de indujo.

Dentro los puntos de proteína seleccionadas para la secuenciación de aminoácidos, una las proteínas identificadas en juveniles de *C. gigas* expuestos a células completas de las tres especies de dinoflagelados (Tabla V), es la proteína Toll de interacción (Tollip). Esta, es una proteína intracelular de unión a ubiquitina implicada en la clasificación de las proteínas ubiquitinadas desde los endosomas a los lisosomas para su degradación, incluida la señalización a través de los miembros del receptor interleucina-1(IL-1R), superfamilia de receptores de tipo Toll (TLR) (Brissoni *et al.*, 2006; Oguro *et al.*, 2011). La Tollip se une a

la ubiquitina a través del dominio CUE (similar al dominio de la proteína cue1 de levaduras) e interactúa con clatrina y Tom1, conduciendo a la formación de un complejo de proteínas múltiples para la degradación de proteínas (Kang *et al.*, 2003;; Oguro *et al.*, 2011).

Dentro de los mecanismos de acción de esta proteína, se conoce que Tollip controla de forma negativa las vías de señalización TLR, previniendo la sobre-activación de la inmunidad innata que conduce a fatales trastornos fatales del sistema inmune. Por lo tanto, la regulación de TLR no sólo activa la defensa inmune innata contra patógenos sino también contra trastornos del sistema inmune (Takeda y Akira, 2005). Así, se puede suponer que en los organismos expuestos a *P. lima* y *P. minimum*, al disminuir la expresión de esta proteína pierden el control de receptores TLR presentando una sobre-activación del sistema inmune, lo que coincide con lo reportado por de las Heras (2009) al observar un incremento en la concentración de hemocitos, mientras que en los organismos expuestos a *P. rhathymum* al observar una sobre-expresión de la proteína Tollip, se estarían inhibiendo las cascadas de señalización que son activadas por TLR, con lo cual las defensas del sistema inmune no estarían funcionando, quedando propensos a ataques por patógenos y ocasionando la muerte de los organismos. Este mecanismo ha sido descrito por Brissoni *et al.* (2006), quienes refieren que esta proteína se localiza en los endosomas y una disrupción en el gen (Tollip) genera la acumulación de IL-1R en los endosomas y por lo tanto una deficiencia en la degradación lisosomal de IL-1R.

Dentro la línea de defensa contra patógenos potenciales, en los moluscos bivalvos se encuentran células inmunocompetentes, hemocitos circulantes y una variedad de efectores moleculares, que son activados por la interacción entre los patógenos asociados a patrones moleculares y los receptores de reconocimiento de patógenos. Dichas células muestran reacciones quimiotácticas y quimiocinéticas, participando en la encapsulación y melanización, llevando a cabo la muerte por fagocitosis (Girón-Pérez, 2010; Venier *et al.*, 2011). Estos eventos son posibles gracias a la acción concertada de transmembrana, lectinas solubles, receptores tipo Toll (TLR) de detección de virus, enzimas hidrolíticas y cascadas proteolíticas de reacción de corta duración citotóxica por productos y péptidos

antimicrobianos (AMP) (Kuchel, 2010; Venier *et al.*, 2011). Estas reacciones, principalmente la melanización, ha sido reportada en diversos estudios con dinoflagelados tóxicos. Estrada *et al.* (2007) describen daño a nivel tisular como melanización en almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* expuesta a *Gymnodinium catenatum*. De igual forma, Wikfors y Smolowitz (1993) reportan melanización en espacios vasculares abiertos, branquias, corazón, riñón y divertículos digestivos de juveniles de *Mercenaria mercenaria* y *Argopecten irradians* al ser expuestos a células de *P. minimum*, lo que indica que este tipo efectos también suceden en *C. gigas*, principalmente en aquellos expuestos a *P. lima* y *P. minimum* donde la expresión de Tollip disminuye.

### **Dihidropteridina reductasa**

La proteína dihidropteridina reductasa (DHPR) (Tabla V) es una enzima que cataliza la reducción del cofactor quinoide dihidropteridina, durante la hidroxilación catalizada enzimáticamente de L-fenilalanina a tirosina, en presencia de NADH o NADPH en el correspondiente cofactor tetrahidropteridina (BH<sub>4</sub>). Este mecanismo que puede producirse tanto de forma espontánea como por la enzima DHPR (Nielsen *et al.*, 1969) y se encuentra ampliamente distribuido en los tejidos de los organismos (Ponzzone *et al.*, 2003). El primer efecto reconocido por la insuficiencia de esta enzima es la deficiencia de BH<sub>4</sub>, cofactor esencial para la formación de la dopamina, noradrenalina, adrenalina y 5-hidroxitriptofano a partir de fenilalanina, tirosina y triptófano, respectivamente (Nielsen *et al.*, 1969; Jeeps *et al.*, 1986; Ponzzone *et al.*, 2003). La perturbación del metabolismo de BH<sub>4</sub> se ha descrito en varias enfermedades neurológicas como la demencia senil del tipo Alzheimer (Jeeps *et al.*, 1986). También se ha sugerido su participación en diversos procesos, tales como el papel secundario reportado con dihidrofolato reductasa en el mantenimiento de folato en la forma tetrahidro en el cerebro (Ponzzone *et al.*, 2003), y en el estrés oxidativo, al observar niveles mayores de esta enzima en *Mytilus trossulus* a 32 °C en comparación con su expresión a 13 °C, 24 °C y 28 °C (Tomanek y Zuzow, 2010). Con lo cual se cree que bajo condiciones naturales, principalmente en verano cuando las temperaturas son elevadas y llegan a ocurrir las mortalidades de organismos de *C. gigas*, esta proteína (tabla V) se esté activando,

principalmente en los organismos expuestos a *P. rhathymum*, en donde se observó una sobre expresión, mientras que con *P. lima* y *P. minimum* se observa una sub-expresión.

## **Dominio 2 de la proteína secretora rica en cisteína LCCL**

Las proteínas secretoras ricas en cisteínas (CRISPs) son glicoproteínas que forman un grupo de la superfamilia de proteínas CRISP, antígeno 5 y Pr 1-(CAP) (Koppers *et al.*, 2011). Este grupo de proteínas se encuentra en una amplia gama de organismos, incluyendo procariontes (Yeats *et al.*, 2003) y eucariotes no vertebrados (Milne *et al.*, 2003); son secretadas por algunos vertebrados, insectos y plantas como venenos y toxinas (King, 1996; Schreiber *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 2001). En mamíferos, se han descrito varios miembros no venenosos de estas proteínas, en los que se revelan 9 familias, dentro de las cuales se encuentran CRISPs con dominios 1 y 2 LCCL (CRISPLD1 y CRISPLD2, respectivamente) (Gibbs *et al.*, 2008). CRISPLD2 se expresa en múltiples tejidos y tiene varias funciones fisiopatológicas: en la regulación inmune, pulmón, riñón, desarrollo craneofacial y la formación de labio/paladar hendido. Estudios realizados por Chen *et al.* (2010) se sugiere que CRISPLD2 es un blanco “río abajo” de la ruta de señalización Wnt (*portmanteaus* de **Int** y **Wg** –wingless- en *Drosophila*) a través de la existencia de un bucle regulador de realimentación CRISPLD2-Wnt. La ruta de señalización Wnt es una red de proteínas que transmite señales de receptores en la superficie de la célula, controlando la  $\beta$ -catenina (Wnt/ $\beta$ -catenina) que tiene un papel fundamental en el desarrollo del esqueleto y la biología ósea postnatal. En presencia del ligando Wnt, la  $\beta$ -catenina citoplasmática se acumula y se transloca al núcleo donde se forma un complejo transcripcionalmente activo con factores de transcripción TCF/LEF para regular los genes diana, y en ausencia de la señal de Wnt, la  $\beta$ -catenina se asocia con un complejo citoplasmático de destrucción, lo que resulta en la fosforilación y la degradación por la vía del proteasoma (Chen *et al.*, 2010). Lo anterior, hace suponer que esta proteína (Tabla V) podría estar implicada en algún mecanismo de fijación del carbonato de calcio en *C. gigas* y que ante la exposición a las tres especies de dinoflagelados tóxicos su expresión se ve disminuida.

## Periostina

Periostina es una proteína de aproximadamente 811 aminoácidos, 90 kDa (Fortunati *et al.*, 2010; Takayama y Kudo, 2012), identificada originalmente en murinos, una familia de roedores y denominada en función de su expresión en el ligamento periodontal y el periostio de los ratones adultos (Kudo, 2011). Esta proteína se expresa predominantemente en tejidos conectivos fibrosos tales como ligamento periodontal (PDL), pericondrio, tendones, córnea y válvulas del corazón, pero también se expresa en otros tejidos, incluyendo la placenta, pulmón, hígado, músculo esquelético, riñón, piel (Horiuchi *et al.*, 1999; Litvin *et al.*, 2006; Norris *et al.*, 2007) y ciertos tumores (Fortunati *et al.*, 2010). Es una molécula de adhesión que tiene una estructura de proteína compuesta en el extremo amino de un pequeño dominio conservado rico en cisteína en la familia Emilin (dominio EMI), una repetición en tándem de 4 dominios fas I (RD1-4) y una región carboxilo-terminal (CTR) que incluye un sitio de unión a heparina. Es un miembro de la familia fasciclina I, basado en los típicos dominios fas I del ligamento periodontal (Takayama y Kudo, 2012; Kudo, 2011). La periostina es una proteína secretada por los osteoblastos, que se puede unir a la heparina, desempeñando un papel en la adhesión y propagación celular, así como en la mineralización de la matriz extracelular (Takeshita *et al.*, 1993; Gillan *et al.*, 2002; Coutu *et al.*, 2008), reportada por Ríos *et al.* (2005) y Kii *et al.* (2006) como una proteína importante en el desarrollo de los huesos y los dientes en ratones, al observar que al mutar (interrumpir) el gen de periostina en ratones, nacen normales pero posteriormente presentan enanismo y erupción dental retardada. De igual forma, Coutu *et al.* (2008) confirman la presencia de periostina en la matriz mineralizada producida por los osteoblastos, demostrando así su alta afinidad. Por lo que, tanto esta proteína como la CRISPLD2 (tabla V) podrían estar implicadas en algún proceso de formación de la concha, y al observarse una disminución en su expresión se estarían afectando propiedades de la concha como, dureza, textura, grosor, etc., no lográndose observar en este estudio algún indicio de que estas características hayan sido afectadas, esto quizás debido al poco tiempo del experimento, sin embargo cabe la posibilidad que en un tiempo de exposición mayor, o

de manera natural, se logren observar cambios, dejándolos propensos a ataques por depredadores.

## **Catepsina L**

La familia de proteínas catepsina se compone de enzimas proteolíticas lisosomales que juegan un papel importante en los organismos en el mantenimiento de la homeostasis. En particular, estas proteasas se encuentran implicadas en la degradación intracelular de proteínas/reemplazo (Hu y Leung, 2004), el procesamiento de antígenos, la maduración de hormonas y la respuesta inmune (Chwieralski *et al.*, 2006). Con base a su distribución tisular se han descrito dos grupos principales de catepsinas: a) el primero compuesto por las catepsinas B, C, F, H, L, O y Z, y b) el segundo conformado por las catepsinas J, K, S y W (Rawlings y Barrett, 1994). La catepsina L se encuentra presente en los lisosomas y está implicado en la degradación de proteínas (Hu y Leung, 2004). Sin embargo, estudios recientes indican nuevas funciones biológicas en las vesículas secretoras, en donde funcionan como una proteasa clave para el procesamiento proteolítico de pro-neuropéptidos y pro-hormonas en neuropéptidos activos que se liberan para mediar la comunicación celular en el sistema nervioso y endocrino (Funkelstein *et al.*, 2008, 2010; Hook *et al.*, 2012).

De todas las catepsinas, la L ha demostrado tener más alta conservación en el dominio del polipéptido que representa la proteasa catalíticamente activa (Bromme, 2001). Estas proteínas también han sido estudiadas en invertebrados, principalmente aquellas relacionadas con la digestión (Cristofolletti *et al.*, 2005), con funciones específicas en el desarrollo temprano -de la artemia- (Liu y Warner, 2006) y en funciones inmunes de bivalvos (Jenny *et al.*, 2002). Jenny *et al.* (2002) reportaron la presencia de catepsina B y Z a partir de EST en hemocitos de *C. virginica*, y Gueguen *et al.* (2003) encontraron catepsina L. Es interesante la observación de que los genes de la catepsina L son los más altamente sobre-expresados en mejillones del género *Mytilus* cuando son expuestos a metales pesados o contaminantes orgánicos (Venier *et al.*, 2006). Roberts (2008) encontró homólogos de las catepsinas Z y L en *C. virginica* mediante alineaciones EST de proteasas

e inhibidores de proteasas, los cuales mostraron una alta identidad con tejidos inhibidores de metaloproteinasas (TIMP) de *C. gigas*. Adicionalmente, se ha demostrado que en *C. gigas* expuestos a bacterias el gen TIMP fue altamente expresado en hemocitos, demostrando ser muy sensibles a la estimulación por patógenos y heridas (Montagnani *et al.*, 2001). Por lo anteriormente mencionado, se sugiere que la Catepsina L (Tabla V) encontrada en el presente trabajo podría estar implicada en algún mecanismo de defensa contra patógenos o como respuesta al reconocimiento de partículas no propias.

### **Tropomiosina**

Las tropomiosinas conforman una familia de proteínas que se aislaron por primera vez de músculo (Bailey, 1948) pero que, al igual que la actina, son también proteínas abundantes del citoesqueleto en células no musculares (Fine y Blitz, 1975). Las tropomiosinas (TMS) consisten de dos cadenas de polipéptidos  $\alpha$ -helicoidales paralelas, de 284 aminoácidos con una masa molecular de ~33 kDa y un pI ~ de 4.5 (López *et al.*, 2002a, 2002b; Ozawa, 2010). Son proteínas de unión a la actina, muy importantes en la regulación de las funciones móviles y contráctiles de las células (Bailey, 1948), específicamente en el músculo estriado, en donde regulan el efecto del calcio sobre la interacción actina-miosina a través de la unión de troponina (a sitios específicos en el péptido tropomiosina), que desempeñan papeles importantes en varios eventos morfológicos, incluyendo la contracción del músculo, la invaginación de tejidos y la migración celular (Vicente-Manzanares *et al.*, 2009; Huan *et al.*, 2012). Esta proteína (Tabla V) fue identificada en juveniles de *C. gigas* expuestos a los tratamientos con las tres especies de dinoflagelados presentando una sobre-expresión. Así mismo, la misma proteína (punto, en el mapa proteómico) también fue observado en los geles con los tratamientos de extractos acuosos y orgánicos, en donde presentó una sub-expresión con los extractos orgánicos, mientras que con el extracto acuoso de *P. minimum* se observó una sub-expresión, con *P. rhathymum* una sobre-expresión y con *P. lima* no se observó cambio alguno. A pesar de los patrones de expresión observados, no se puede hacer inferencia sobre el efecto en dichos tratamientos debido a que solamente fueron analizados los correspondientes al tratamiento con células completas y no se tiene certeza de que representaban la misma proteína.

La sobre-expresión de tropomiosina ha sido reportada por diversos autores ante la exposición a algunos contaminantes, como Rodríguez-Ortega *et al.* (2003), quienes observaron la sobre-expresión en las isoformas putativas de tropomiosina y miosina de cadena ligera en *Chamela gallina* al exponerlos a Aroclor 1254 (una mezcla de bifenilos policlorados denominados tóxicos bioacumulativos persistentes) y Cu (II). De igual forma, Thompson *et al.* (2011; 2012) al analizar los efectos por contaminación de metales en *Saccostrea glomerata*, han reportado que las proteínas asociadas a la actividad del citoesqueleto (actina, actina-2, tropomiosina y miosina) son afectadas por la exposición a cobre y plomo, y con este último la concentración de tropomiosina se incrementó cuatro veces. La alteración de estas tres proteínas del citoesqueleto por Cu o Pb indica que estos metales pueden afectar la motilidad y la plasticidad de hemocitos en *S. glomerata*, con derivaciones a procesos celulares como la cicatrización de heridas y fagocitosis. No obstante la sobre-expresión de tropomiosina en juveniles de *C. gigas* ante la exposición de las tres especies de dinoflagelados sugiere la posibilidad de que algunos procesos biológicos, como la actividad del citoesqueleto, las funciones contráctiles celulares y la constricción del músculo abductor se hayan alterando.

### **Cadena ligera esencial de miosina**

Las miosinas son una gran familia de proteínas contráctiles (Park *et al.*, 2011), que son altamente conservadas en su morfología general y en la composición de subunidades. Estas moléculas consisten de dos cadenas pesadas, dos cadenas ligeras esenciales (ELC) y dos cadenas ligeras reguladoras (RLCs) (Fromherz, 1995). En el músculo esquelético de vertebrados es regulado por el sistema tropomiosina-troponina (Houdusse y Cohen, 1996). En contraste, en las miosinas de músculo de moluscos, la contracción está regulada por enzimas cuya actividad se activa por la unión directa de  $\text{Ca}^{2+}$  a miosina, cuyo dominio regulador es una proteína interruptor que enciende el motor en respuesta a la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  (Houdusse y Cohen 1996; Szent-Györgyi *et al.*, 1999).

En los moluscos bivalvos, especialmente los pectínidos (escalopas), es donde más se han estudiado las interacciones de la miosina, determinándose que la regulación del

musculo por miosina es controlada por la unión directa de  $\text{Ca}^{2+}$  a ELC, que es importante para la estabilidad estructural del dominio  $\alpha$ -helicoidal del brazo de palanca de la cabeza de miosina, cuyo sitio de unión de  $\text{Ca}^{2+}$  es un motivo-mano en ELC que se estabiliza por enlaces relacionados con la cadena pesada y dos RLC, lo que finalmente representa la necesidad de las tres cadenas para la fijación y regulación del  $\text{Ca}^{2+}$  en la molécula de miosina intacta (Xie *et al.*, 1994). En moluscos la unión del  $\text{Ca}^{2+}$  a ELC regula la comunicación entre ELC y RLC, que provoca la contracción de músculo (Fromherz, 1995; Kumar *et al.*, 2011). Por lo que al disminuir la expresión de esta proteína en juveniles de *C. gigas* por la exposición a las tres especies de dinoflagelados (Tabla V), se sugiere que la contracción muscular en el ostión se ve afectada (en tejidos como el musculo abductor, que se encuentra conformado por musculo estriado y liso, afectando la apertura y cierre de valvas). Sin embargo, la función de la ELC en la contracción del músculo liso y estriado, especialmente en *C. gigas* aún es poco comprendido.

### **8.2.2. Efecto de la exposición de juveniles de *C. gigas* a extractos acuosos de tres especies del genero *Prorocentrum***

#### **Actina citoplasmática**

La actina es una de las proteínas más abundantes en las células eucariotas; la mayoría de los organismos tienen varios genes que la codifican. Es un componente fundamental del citoesqueleto en las células musculares y no musculares, representando el 12-15% de la proteína total en la mayoría de las células no musculares y alrededor del 30% en células musculares (Rodríguez-Ortega *et al.*, 2003). La actina es una proteína altamente conservada que puede encontrarse en forma libre (actina G) o en forma de polímeros lineales (actina F), participa en más interacciones proteína-proteína que cualquier otra proteína conocida (Wolfgan y Vandekerckhove, 1992; Schmidt y Hall, 1998; Domínguez y Holmes, 2011). Estas propiedades, le permiten ser un elemento indispensable en muchas funciones celulares, que van desde la motilidad celular y el mantenimiento de la forma de las células, hasta la polaridad para la regulación de la transcripción. En cuanto al mantenimiento de la

forma de las células está implicada en la formación de filamentos (componentes principales del citoesqueleto que interactúan con la miosina para producir un efecto de deslizamiento) que son la base de la contracción muscular; además, participa en muchos otros aspectos de la movilidad celular, incluyendo la citocinesis (Wolfgang y Vandekerckhove, 1992; Domínguez y Holmes, 2011).

Estas proteínas son comúnmente afectadas en los moluscos bivalvos por diversos factores. Se ha observado que en hemocitos de mejillones la actina parece estar implicada en procesos glutationización y carbonilación, mecanismos que han sido considerados como de protección temprana contra el estrés oxidativo (Shelton *et al.*, 2005; Dailianis *et al.*, 2009). Por lo que se sugiere esta proteína podría estar relacionada con los hemocitos en el mecanismo de defensa, en donde ante la exposición a *P. lima* (dinoflagelado más tóxico) se requiere de una mayor protección, por lo que se está ocasionando una sobre-expresión, mientras que con las especies de menor toxicidad se observa una sub-expresión, con lo cual los mecanismos de defensa no estaría funcionando adecuadamente, quedando propensos a ataques por patógenos.

### **Cavortina**

La cavortina, es una proteína principal de la hemolinfa de *C. gigas*, consta de 174 residuos de aminoácidos, tiene un peso de 19.4 kDa y es rica en histidina y ácido aspártico (Scotti *et al.*, 2007); y se le ha denominado también como superóxido dismutasa extracelular de *C. gigas* (CgEcSOD) González *et al.* (2005). Se ha mostrado que la cavortina exhibe una alta similitud con proteínas como la pernina del mejillón *Perna canaliculus* (Scotti *et al.*, 2001) y la superóxido dismutasa extracelular de *S. glomerata* (SgEcSOD) (Green *et al.*, 2009). Esta proteína consiste de un solo dominio SOD Cu/Zn (superóxido dismutasa) que muestra homología con cada uno de los tres dominios de tipo SOD de la pernina (Scotti *et al.*, 2001). Presenta afinidad por varios cationes divalentes, especialmente el hierro, y a cada monómero es capaz de unirse 8-11 iones de hierro, sin embargo, se cree que esta proteína puede secuestrar más hierro al formar partículas esféricas (Scotti *et al.*, 2001). Aunque la función del dominio y proteínas homólogas es

incierto, se ha reportado la capacidad de esta proteína para secuestrar el hierro (que es un metal esencial para algunos patógenos) y posiblemente limitar su disponibilidad, lo que sugiere un posible papel en la defensa del huésped. Otras posibles funciones son antioxidación, reparación de heridas, transporte de metales y la mineralización de la concha, lo cual lleva a la conclusión de que probablemente es una proteína de dominio multifuncional (Green *et al.*, 2009; Itoh *et al.*, 2011). No obstante, la verdadera función aún se discute, ya que otros estudios han implicado a la EcSOD como una proteína importante involucrada en la resistencia a enfermedades. En semillas de *C. gigas* Huvet *et al.*, (2004) encontraron que la expresión de esta proteína está regulada, ya que descubrieron que la transcripción de cavortina fue mayor en el manto y gónada de ostiones resistentes a la mortalidad de verano, que en susceptibles. Mientras que otros más han observado una sobre-expresión de EcSOD, en *A. irradians* después de 14 h de haber sido inyectadas con *Vibrio anguillarum* (Bao *et al.*, 2008). Observándose resultados similares en la presente investigación (Tabla VI), en donde organismos de *C. gigas* presentaron una sobre-expresión de cavortina (CgEcSOD) al ser expuestos a *P. lima*, por lo que se considera que esta proteína podría cumplir una función muy importante en la defensa de *C. gigas* contra dinoflagelados tóxicos, ya que esta es la especie que presenta mayor toxicidad, mientras que con las otras dos especies de dinoflagelados que muestran un menor grado de toxicidad se observó una disminución de la expresión.

### **Proteína disulfuro isomerasa A6**

La proteín-disulfuro isomerasa (PDI) es una proteína abundante y soluble en el lumen del retículo endoplasmático (RE) de células eucariotas, que también se han encontrado en la superficie de la célula o como proteína secretada, presente en el citosol, las mitocondrias, núcleo y otros lugares no-RE (Leung *et al.*, 2011; Sha *et al.*, 2012). La familia PDI tiene varias proteínas bien caracterizadas, reportándose en células de mamíferos alrededor de 20 miembros (Appenzeller-Herzog *et al.*, 2008). Están implicadas en el plegamiento de proteínas, catalizando la formación y reestructurado la isomerización de enlaces disulfuro intramoleculares de la cisteína en el RE, participa en la producción de fibrina, la adhesión

celular y en la señalización óxido nítrico (Sha *et al.*, 2012; Talakhun *et al.*, 2012). También se ha encontrado como un regulador de la homeostasis redox en el RE (Appenzeller-Hertzog *et al.*, 2008) y actualmente existe evidencia de que juega un papel importante en la invasión de la célula huésped, y son objetivos relevantes para la respuesta inmune en invertebrados y mamíferos (Sha *et al.*, 2012).

La PDI de la familia A 6 (PDIA6), también conocida como proteína del retículo endoplasmático 5 (ERP5), proteína disulfuro isomerasa P5 (P5) o proteína tiorredoxina dominio 7 (TXNDC7), en humanos es una proteína de 440 aminoácidos que incluye dos secuencias de sitio activo dominios redox con "CGHC" (Hayano *et al.*, 1995) y funciona como una chaperona que inhibe la agregación de proteínas mal plegadas (Kikuchi, *et al.*, 2002). En el presente estudio la sobre-expresión de PDIA6 (Tabla VI) en organismos expuestos a *P. lima* indique muy probablemente la activación del algún mecanismo de respuesta inmune o bien estrés del retículo endoplasmático en los tejidos. Este efecto que fue descrito por Leung *et al.* (2011) en hepatopáncreas de *P. viridis* expuestos a Cd al observar una sobre-expresión (> 6) de PDI, la sobre-regulación (>2) de calreticulina, proteína P5 y un incremento significativo de ATPsintetasa subunidad beta, lo que les llevo a sugerir estrés del retículo endoplasmático.

Así también este incremento en la expresión de PDIA6 podría deberse a un incremento en la capacidad de plegado dentro del retículo endoplasmático, ya que una acumulación de proteínas mal plegadas pueden alterar la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  RE, y los cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  afectan la síntesis de proteínas, por lo que este incremento implica la sobre-expresión de reguladores del RE, sus co-chaperones (PDIA6) y sus co-factores como  $\text{Ca}^{2+}$  y ATP (Schroder, 2008). Si bien es cierto, esta familia de proteínas han sido ampliamente descritas como proteínas del retículo endoplasmático (involucrada en el control de calidad), en estudios recientes realizados por Talakhun *et al.* (2012) se reportó la expresión de PDIA6 en gónadas (ovarios y testículos), intestino, órganos linfoides y en menor proporción en el estómago, las branquias, hemocitos, hepatopáncreas, corazón y pleópodos de *Penaeus monodon* (PmPDIA6), lo que sugiere que desempeña un papel

importante durante el desarrollo ovárico y testicular en estos crustáceos. Lo anterior, nos hace suponer que la PDIA6 también podría estar relacionada con disrupción hormonal observada por de las Heras (2009) en los organismos expuestos tanto a los extractos acuosos y orgánicos como a diferentes densidades celulares de especies de *Prorocentrum*, ya que ha sido reportada en *C. gigas* por Corporeau *et al.* (2012) como una molécula chaperona sobre-acumulada en ovocitos de alta calidad, que cataliza el reordenamiento de los enlaces disulfuro en proteínas, particularmente de la vitelogenina. Dicha sobre acumulación podría reflejar una mayor capacidad de los ovocitos para producir vitelogenina madura, y/o control de la fusión espermato-óvulo en los ostiones, misma que ha sido reportado por Ellerman (2006) en mamíferos.

### **3-Hidroxiantranilato 3,4-Dioxigenasa**

3 hidroxiantranílico ácido 3,4-dioxigenasa (3HAO) es una enzima citosólica que pertenece a la familia de dioxigenasas intramoleculares, dioxigenasa estradiol no hemo ferroso, responsable de la conversión de ácido 3-hidroxiantranílico (ácido 2-amino-3-hidroxibenzoico; 3HANA) a ácido quinolínico (2,3-piridindicarboxílico ácido; QUIN). Actúa en la etapa final de la vía de quinurenina, donde cataliza la apertura del anillo de 3HANA con la incorporación de ambos átomos de oxígeno molecular, dando lugar a un semialdehído ácido inestable intermedio de 2-amino-3-carboxymuconico, mediante la activación de N-metil-Daspartato (NMDA) y el precursor de la biosíntesis de NAD<sup>+</sup> en la vía de biosíntesis de triptófano (Li *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2005). El 3HAO es un homodímero con una topología de subunidad característico del pliegue barril cupin; cada monómero contiene dos sitios de unión del hierro. El hierro catalítico está enterrado profundamente en el barril cupin y el otro sitio de hierro forma un centro FeS<sub>4</sub> cerca de la superficie del solvente, separados por aproximadamente 24 Å (Zhang *et al.*, 2005). Esta proteína sobre-expresada con *P. lima* y sub-expresada con *P. minimum* y *P. rhathymum* (tabla VI) fue identificada dentro las bases de datos de *C. gigas*, y aunque su función ha sido descrita en humanos no existen estudios publicados que indiquen su posible función en los moluscos bivalvos, particularmente en *C. gigas*.

### 8.2.3. Efecto de la exposición de juveniles de *C. gigas* a extractos orgánicos de tres especies del genero *Prorocentrum*

#### Troponina C

La troponina, un sensor de detección molecular de  $\text{Ca}^{2+}$  que regula la contracción muscular, es un complejo de proteínas compuesto de tres subunidades: troponina C (TnC; subunidad de receptor de calcio), troponina T (TnT; subunidad tropomiosina de anclaje) y la troponina I (TnI; subunidad actomiosina inhibidor ATPasa), que trabajan en conjunto para regular la actividad de la actina-miosina (Farah y Reinach, 1995; Perry, 1999, 2003, Hooper *et al.*, 2008; Solaro, 2008; Li *et al.*, 2011; Umasuthan *et al.*, 2012, Zhang *et al.*, 2012) y normalmente se encuentran en los filamentos delgados compuestos por monómeros tropomiosina y actina (Li *et al.*, 2011).

La troponina C (TnC) es una de las subunidades que se expresa principalmente en el tejido muscular y juega un papel importante en la regulación de la contracción (Umasuthan *et al.*, 2012). Durante la contracción muscular, la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  al dominio N-terminal de TnC (NTNC) inicia un cambio conformacional que expone su cavidad central hidrofóbica, cambiando las interacciones de unión de la subunidad inhibidora TnI a partir de los monómeros de actina para el núcleo hidrofóbico TnC. Posteriormente desencadena un cambio completo en el complejo de troponina, generando el ciclo de puente cruzado que resulta en la contracción del músculo (Li *et al.*, 2011). Diversas isoformas de TnC han sido identificadas en tejidos específicos, los vertebrados poseen dos isoformas de TnC, llamadas troponina C1 (TNNC1) y troponina C2 (TNNC2), que se expresan en músculo esquelético/ cardíaco lento y rápido (respectivamente), mientras que en los invertebrados se han descrito múltiples isoformas de TnC (Yuasa y Takagi, 2000; Chao *et al.*, 2010; Umasuthan *et al.*, 2012). En ambos tipos de organismos, la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  a la TnC provoca cambios conformacionales del complejo heterotrimérico e inicia una cascada que conduce a la contracción muscular. Por lo tanto, TnC es un componente vital del proceso de contracción muscular inducida por los cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Umasuthan *et al.*, 2012).

A pesar de la información que existe actualmente sobre la TnC en vertebrados, en los moluscos bivalvos solo se han caracterizado las TnCs en vieiras (Nishita *et al.*, 1994; Yuasa y Takagi, 2000) y almejas (Umasuthan *et al.*, 2012). En estos organismos la TnC es la unidad de detección de  $\text{Ca}^{2+}$  (jugando un papel clave en la contracción muscular), por lo que la sobre-expresión de esta proteína (Tabla VII) podría estar relacionada con la contracción del músculo abductor, necesario para mantener cerradas las valvas, así como también en la contracción del manto observado en *C. gigas* durante el bioensayo. Sin embargo, en estudios llevados a cabo en *Chlamys farreri* por Chen *et al.* (2011) se observó sobre-expresión de tropomiosina y TnC como respuesta a la necrosis viral por infección aguda de virus (AnnV), lo que indica la posible activación de hemocitos en respuesta a esta infección, no descartándose la posibilidad de que algo similar pueda estar ocurriendo en *C. gigas* como respuesta a daños tisulares.

### **Proteína 1 de *C. gigas* relacionada con la endimina de mamíferos**

Las endiminas (EPD) son glicoproteínas secretadas que forman el componente principal del líquido cefalorraquídeo en los peces teleósteos (Apostolopoulos *et al.*, 2001; Suárez-Castillo y García-Arrarás, 2007). Fueron originalmente descritas en la zona endimial del cerebro de peces “goldfish”, siendo el componente principal del líquido cefalorraquídeo (LCR) en diversos órdenes de peces teleósteos (Hoffmann y Schwarz, 1996). El gen que codifica esta proteína ha sido reportado en humanos, invertebrados deuterostomados como pepinos de mar, así como en protostomados (Suárez-Castillo *et al.*, 2004; Suárez-Castillo y García-Arrarás, 2007), encontrándose poca similitud entre las secuencias de aminoácidos de estas proteínas, conservado estrictamente cuatro residuos de cisteína, un residuo de triptófano y posiciones de algunos otros aminoácidos. Además, todas las proteínas relacionadas con endimina contienen al menos un sitio de N-glicosilación (Ganss y Hoffmann, 2009). Se han identificado diversas variantes de endimina y sus funciones aún se están dilucidando, una importante es la unión del calcio a través de residuos de ácido siálico N-ligados (Ganss y Hoffmann, 1993; Hoffman, 1994), así como su participación en la regeneración a través de su forma unida asociada con fibrillas de colágeno de la matriz extracelular (Ganss y Hoffmann, 2009).

Las EPD han sido estudiadas mediante múltiples ESTs de metazoos y bases de datos del genoma, para análisis filogenéticos y la evaluación de la presión de la selección natural, encontrándose que cuatro de las nuevas secuencias EPD corresponden a *C. gigas*, *C. virginica*, *Aplysia californica* y *Biomphalaria glabrata*, este descubrimiento es muy importante ya que se creía que las EPD solo eran específicas de cordados (Suárez-Castillo y García-Arrarás, 2007). La secuencia EPD de *C. gigas* ha sido estudiada por Boutet *et al.* (2004) y demostraron después de una semana de exposición a hidrocarburos, que en la glándula digestiva esta regulada y dado que la glándula digestiva (al igual que el hígado) desempeña funciones importantes en el metabolismo y desintoxicación, se sugiere que la sobre-expresión de esta proteína en *C. gigas* (Tabla VII) podría estar desencadenando rutas metabólicas que impliquen mecanismos de desintoxicación.

### **Proteína citoplasmática de filamentos intermedios no neuronales**

Los filamentos intermedios (FI) son componentes primordiales del citoesqueleto y la membrana nuclear que forman estructuras filamentosas de 8 a 14 nm de ancho, que se extienden desde la membrana celular hasta el núcleo y, por anclaje en las uniones intercelulares, contribuyen a coordinar a las células individuales dentro de los tejidos (Mencarelli *et al.*, 2011). Su nombre se deriva de su diámetro (10 nm), que originalmente fue utilizado para destacar su carácter intermedio entre los filamentos delgados de actina y los filamentos gruesos de miosina, más tarde se centró en las diferencias de anchura entre los filamentos de actina (6 nm), los FI, y los microtúbulos (23 nm), que en conjunto constituyen el citoesqueleto eucariota superior (Fuchs, 1994)

Estas proteínas son miembros de una familia multigen muy grande, que se ha subdividido en cinco subgrupos principales, cuatro de los cuales se pueden clasificar en filamentos intermedios citoplasmáticos (que son mucho más variados y forman redes de células específicas en tejidos animales), mientras que el quinto representa las laminas nucleares, que son universales en metazoos (Di Bella *et al.*, 2009; Herrmann y Strelkov, 2011; Mencarelli *et al.*, 2011). Todas las proteínas IF son estructuralmente similares, consisten de un conjunto central o dominio  $\alpha$ -helice dispuesto en espiral formando una

bobina, denominada dominio de varilla, con al menos dos interrupciones cortas; un dominio N-terminal no helicoidal (cabeza) y un dominio C-terminal (la cola), que es también no helicoidal, ambos con una variación de longitud extrema entre las diferentes proteínas IF. El dominio C-terminal se caracteriza por la laminas, y el dominio de varilla se divide en subdominios (bobinas 1a, 1b, 2a y 2b) por enlaces cortos no helicoidales (L1, L12, L2). La longitud de la varilla (y de sus diferentes subdominios) se define y se conserva a través de las especies (Dhe-Paganon *et al.*, 2002; Herrmann y Strelkov, 2011). Están reguladas a través de múltiples interacciones con IF-proteínas asociadas (IFAPs), que incluyen moléculas de señalización, como proteínas 14-3-3, relacionadas con apoptosis, quinasas y fosfatasa (Green *et al.*, 2005), y por modificaciones postraduccionales (PTM) (Toivola *et al.*, 2010).

Las proteínas FI comparten varias características con las proteínas de choque térmico (HSP), incluyendo la abundancia, la sobre-expresión o incremento significativo en respuesta a una variedad de tipos de estrés, funciones citoprotectoras que incluyen inhibición de la apoptosis, homeostasis en orgánulos y fenocopia de varias enfermedades después de las mutaciones de la proteína FI o HSP. Aunado a esto, se ha observado que los niveles de expresión incrementan de 3-4 veces en respuesta al estrés, de forma muy similar a HSP, aunque se desconoce si la sobre-expresión *per se* protege del estrés al igual que HSP y/o promueve una respuesta regenerativa (Toivola *et al.*, 2010). Dado lo anterior, la sobre-expresión observada de esta proteína (Tabla VII) en juveniles de *C. gigas* expuestos a extractos acuosos de dinoflagelados sugiere que deben ser consideradas como proteínas de estrés altamente especializadas que promueven en *C. gigas* la organización del citoesqueleto celular y la homeostasis.

### **Isoforma 2 de proteína-quinasa dependiente de $\text{Ca}^{2+}$**

En plantas superiores, así como en animales y microorganismos, el calcio juega un papel fundamental como un segundo mensajero mediante la regulación de muchos aspectos de la señalización celular (Bush, 1995). Es liberado de los compartimentos intracelulares y las proteínas reguladoras de calcio tales como la calmodulina (CaM) y quinasas

dependientes de calcio (CDPKs) (Nagamune *et al.*, 2008). Las CDPKs son quinasas únicas, reguladoras de calcio que se encuentran en plantas terrestres, algas verdes y determinados protistas (ciliados y apicomplexans) (Hrabak *et al.*, 2008). Surgen por la fusión de genes de una serin/treonin quinasa situada “rio arriba” con un dominio de unión mano EF Ca<sup>2+</sup> “rio abajo”, que se originó a partir de un gen de calmodulina (Batistič y Kudla, 2012). Presentan tres dominios: uno N-terminal variable, uno catalítico y uno semejante a calmodulina con una región de autoinhibición (Harper *et al.*, 1991; Prakash y Jayabaskaran, 2007).

En las plantas, la señalización de calcio es esencial como segundo mensajero para controlar muchos mecanismos específicos implicados en la transducción de señales de Ca<sup>2+</sup> y en aspectos clave del crecimiento, desarrollo, estrés y como principal mediador en la respuesta inmune (Oh *et al.*, 2012; Liese y Romeis, 2012; Boudsocq y Sheen, 2013). Los mecanismos que implican la regulación de la fosforilación de proteínas por Ca<sup>2+</sup>, a través de CDPKs, se activan por concentraciones micromolares o submicromolar de Ca<sup>2+</sup> libre y no requieren calmodulina exógena (Oh *et al.*, 2012).

Las proteínas CDPKs han sido observadas en diversas localizaciones celulares como el citosol, núcleo, membrana plasmática, el retículo endoplásmico (ER), tonoplastos, las mitocondrias, los cloroplastos, los cuerpos oleosos y peroxisomas, lo que indica que en la célula tienen acceso a una gran cantidad de sustratos potenciales a través (Boudsocq y Sheen, 2013), y su expresión diferencial ha sido observada en respuesta a diversos estímulos, incluyendo el ácido abscísico (ABA), frío, sequía, salinidad, el calor, los inductores y los patógenos, por lo que se le ha relacionado con la presencia de respuestas al estrés (Romeis *et al.*, 2001; Wan *et al.*, 2007; Boudsocq y Sheen, 2013).

Sin embargo, dada su alta afinidad al ion calcio y sus funciones como regulador en la transducción de señales de calcio, esta proteína (Tabla VII) también podría estar implicada en el proceso de fijación de calcio para la formación de concha, debido a que la composición de las conchas en moluscos es del 95% a 99% de cristal de carbonato de calcio y menos del 5% de matriz orgánica, que a pesar de constituir una fracción muy pequeña, se cree que es de suma importancia para la construcción del biocompuesto y sus

propiedades finales, ya que controla la nucleación, el crecimiento y la forma del cristal, así como la elección de carbonato de calcio polimorfo (Addadi *et al.*, 2006; Mann *et al.*, 2012).

### **Helicasa del ARN-spliceosoma**

La proteína ARN-helicasa del spliceosoma (también conocida como BAT1 o UAP56) es una proteína caja DExD/H, helicasa de ARN dependiente de ATP que tiene actividad ATPasa (el uso de la energía derivada de la hidrólisis de ATP se emplea para desenrollar la doble hebra de RNA) (Sahni *et al.*, 2010). Esta proteína está presente en todas las células eucariotas, bacterias y Archaea (Linder y Jankowsky, 2011), y se encuentra filogenéticamente agrupada con el factor de iniciación eucariótico eIF4A, que es esencial en el corte y empalme del ARN necesario para el montaje del spliceosoma y la posterior exportación del ARNm desde el núcleo hasta el citoplasma; sin embargo, su papel en la síntesis de proteínas aún no es bien conocido (Kota *et al.*, 2008; Sahni *et al.*, 2010; Tuteja, 2011). Se ha demostrado que esta proteína regula la síntesis de proteínas y el crecimiento en los cardiomiocitos, al encontrar que UAP56 salvaje (WT UAP56) aumenta la síntesis de proteína inducida por suero en células HeLa, en comparación con mutantes de UAP56 que carecen de ATPasa, en donde la actividad helicasa inhibió la síntesis de proteína, lo que sugiere que la actividad ATPasa y ARN helicasa de UAP56 es importante para la síntesis de proteínas. Así también Schmid y Linder (1991) con mutaciones en los motivos I y II de eIF4A en *Saccharomyces cerevisiae* demostraron un bloqueo de la traducción y el crecimiento celular.

Los genomas eucariotas presentan una gran cantidad de secuencias no codificantes comúnmente conocidas como intrones, que interrumpen periódicamente genes funcionales y por lo tanto eliminados antes de la utilización de la información genética de la célula. Después del empalme, el ARN maduro es exportado desde el núcleo hasta el citoplasma y cualquier error en el proceso de reconocimiento, la eliminación de los intrones o en el empalme, daría lugar a cambios en el mensaje genético y lo que tiene consecuencias potencialmente catastróficas (Wu y Singh, 2012). Esto hace suponer que al observar una sobre-expresión de esta proteína en los organismos expuestos a extractos orgánicos, se

genera un proceso acelerado de síntesis de proteínas que explicaría el incremento en la expresión observado en los organismos expuesto a células completas, en el que se prueba el efecto de la exposición de *C. gigas* a cada una de las especies de *Prorocentrum* simulando condiciones ambientales.

### **8.3. Electroforesis bidimensional**

El uso de organismos vivos como bioindicadores, para evaluar los ambientes acuáticos, se ha convertido en un componente cada vez más importante de la investigación en ecotoxicología (Monsinjon y Knigge, 2007; Muralidharan *et al.*, 2012), principalmente en ambientes marinos afectados por contaminantes de origen antropogénico, en los que se encuentran en forma de compuestos químicos, metales pesados, efluentes industriales y aguas residuales (Devier *et al.*, 2005) y otros de origen natural como las toxinas producidas por diversos organismos marinos como las microalgas. En numerosos estudios han demostrado que los moluscos bivalvos, en particular ostras y mejillones, pueden ser utilizados con éxito para estudios ecotoxicológicos, debido a que en el medio marino son una parte esencial de la cadena alimenticia y tienen una alta capacidad de bioacumulación, que los hace útiles bioindicadores en este tipo de ecosistemas (Phillips, 1976; Hietanen *et al.*, 1988; Carvalho *et al.*, 2000; Fang *et al.*, 2003; Muralidharan *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2012).

Las respuestas naturales a estos procesos son conocidos por cambiar el mapa proteómico de un organismo, en donde análisis comparativos de las "ómicas" como lo son la Proteómica, Metabolómica, Metagenómica, etc., puede llevarse a cabo, ya que estos análisis son útiles para establecer diferencias cualitativas y cuantitativas entre los organismos (Hogstrand *et al.*, 2002, 2012; Rodrigues *et al.*, 2012). El presente trabajo se realizó como un estudio cualitativo de los cambios en la expresión de proteínas, inducidos por la exposición a células de tres especies de dinoflagelados en concentraciones a las cuales comúnmente pueden estar expuestos de manera natural, así como también a cada uno de sus extractos orgánicos y acuosos. El propósito de este trabajo fue generar información para tratar de entender y explicar los efectos que el contacto de ostiones juveniles con especies FANs o con extractos acuosos y orgánicos obtenidos a partir de

ellos pueden ocasionar a nivel del proteoma, y analizar sus implicaciones en las rutas metabólicas. Lo anterior, por que se han observado grandes mortalidades de ostiones en ciertas temporadas y bajo determinadas circunstancias, asociadas a diversos factores (entre ellos la presencia de FAN), sin que exista el suficiente conocimiento sobre los procesos que suceden a nivel celular. Para esto se eligió como estrategia metodológica la proteómica, en cuyo nacimiento y evolución la electroforesis bidimensional en gel ha sido fundamental, aunque ya no es una herramienta de separación exclusiva de esta área (Rabilloud *et al.*, 2010).

La electroforesis en gel de poliacrilamida ha sido extremadamente útil como herramienta analítica, para la separación y cuantificación de especies de proteínas a partir de mezclas complejas (Farrell, 1975). La electroforesis bi-dimensional (2-DE) tiene un amplio poder de resolución que le confiere la capacidad de separar miles de puntos de proteínas (Liao y Huang, 2011; Zapata y Wick, 2012), sin embargo, existen diversas limitaciones asociadas con la dinámica de resolución de geles 2-DE, dentro de los que se puede mencionar: a) los geles bidimensionales generalmente son capaces de resolver sólo proteínas/péptidos dentro de un intervalo de peso molecular de ~ 20 a 100 kDa y puntos isoeléctricos (pI) de pH 3 a 10. b) en estudios proteómicos no es factible la separación de proteínas relevantes de las irrelevantes. Es decir, puntos que potencialmente contienen más de un tipo de proteína/péptido, en los que es probable que sólo una o dos de estas proteínas/péptidos son esenciales en la diferencia biológica observada, mientras que las demás son proteínas/péptidos que co-migraron debido a un poder limitado de resolución (Zapata y Wick, 2012). Lo anterior explica los resultados obtenidos en la secuenciación de los puntos 11, 14 y 31 en los organismos expuestos a células completas (Tabla V), y los 27 y 58 en los extractos acuosos (Tabla VI) y orgánicos (Tabla VII) respectivamente. En estas muestras se obtuvieron secuencias de péptidos que corresponden a más de una proteína, lo cual de acuerdo con Tomanek (2011), estos patrones de co-expresión son indicativos de asociación a través de una vía celular común, por ejemplo la glucólisis, o de la interacción directa a través de interacciones proteína-proteína. Tales patrones son un paso hacia una comprensión más completa de la dinámica de los sistemas de células en respuesta a las

perturbaciones por el medio ambiente (Souchelnytskyi, 2005), sin embargo, visto desde otro punto de vista la co-migración de proteínas puede confundir la detección de proteínas importantes causales y la interpretación de los resultados, tanto para la comparación cuantitativa de la expresión de proteínas como para el alineamiento en las bases de datos (Gygi *et al.*, 2000); la interpretación podría resultar difícil debido a la incertidumbre resultante de la presencia de una mezcla de proteínas que pueden participar en el mecanismo biológico estudiado y proteínas irrelevantes que solamente estén formando parte del fondo (background).

En el caso del punto 10 (Fig. 20), que se expresó de manera constante en cada uno de los experimentos y controles, no se logró asignar identidad mediante el análisis de alineamiento por lo que se dejó en estatus de proteína putativa. Según Zapata y Wick (2012), estos casos particulares pueden deberse a que en este tipo de análisis es muy común percibir que en un gel 2-DE cada punto corresponde a una proteína individual y, por lo tanto, se infiere que el número de puntos identificados corresponde al mismo número de proteínas que pueden ser identificadas después del análisis de espectrometría de masas. Sin embargo, no siempre sucede así ya que frecuentemente en estudios 2-DE se reportan resultados de secuenciación incompletos, debido a que las proteínas que componen las manchas no son identificables; este tipo de problemas técnicos se presentan en la mayoría si no en todos los procesos proteómicos en cierta medida.

En el presente trabajo el bajo número de puntos de proteína encontrados en los geles de cada uno de los experimentos puede estar relacionarse a la co-migración, en los términos que fue explicada anteriormente, así como también (en cierto grado) por el tamaño de geles empleados (7 cm). Otro factor que puede contribuir fuertemente a este comportamiento es la optimización del procedimiento de separación, que es indispensable para mejorar la sensibilidad y la obtención de resultados reproducibles, dadas las propiedades de las variables y a los componentes de las muestras de proteínas extraídas de diferentes tejidos o células (Kahn, 1995; Liao y Huang, 2011). En esta investigación se tuvieron diversos problemas para estandarizar la técnica con las muestras analizadas, por el tamaño de los organismos y su origen. De acuerdo con Jurgen *et al.* (2011) las muestras de origen marino

son conocidas por tener concentraciones extremadamente altas de sales (Fig. 10) y lípidos que interfieren con los protocolos 2-DE por lo que es necesario eliminarlas. Así también, dentro de la optimización de la técnica, encontramos que la solubilidad de la proteína es un factor crítico para el éxito de la 2-DE, siendo el cuello de botella más frecuente para la separación eficiente de proteínas, que por lo general no se alcanza en la solubilización inicial, sino en mantener la solubilidad a lo largo de la etapa de isoelectroenfoque (IEF) (Rabilloud, 2009). Un buen resultado requiere que las proteínas estén bien solubilizadas antes y durante el procedimiento de separación, sin embargo, la heterogeneidad de la muestra puede conducir a las diferentes solubilidades de proteínas y la presencia de proteínas muy abundantes lo que complica la extracción, solubilización y el análisis de las especies menos abundantes (Leimgruber, 2005).

Es muy difícil predecir el tamaño del proteoma de la especie en estudio aunque el genoma de la especie sea conocido (Zhang *et al.*, 2012), debido al splicing alternativo y al alto nivel de polimorfismo presente en los ostiones y muchos invertebrados marinos (Hedgecock *et al.*, 2005; Small *et al.*, 2007). En este trabajo se logró identificar un promedio de 511 puntos de proteínas (por los tres tratamientos), que comparado con estudios realizados en el proteoma de algunos moluscos bivalvos como *M. edulis*, *M. galloprovincialis* (López *et al.*, 2002) y *Chamaelea gallina* (Rodríguez-Ortega *et al.*, 2003) en donde se obtuvieron 1287 y 1000 puntos de proteínas respectivamente, estaríamos analizando alrededor del 39-50% del proteoma de *C. gigas*. Cabe destacar que en esos estudios los organismos empleados eran adultos, en cambio en otro estudio llevado a cabo en larvas de *M. galloprovincialis* se identificaron un promedio de 350 puntos de proteínas (López *et al.*, 2005), con lo que estimamos que el proteoma analizado de *C. gigas* representa una buena proporción del proteoma completo, tomando en cuenta que los organismos eran juveniles de 5-7 mm y que se emplearon con concha, debido a las complicaciones de su disección en aras de mantener la integridad de las muestras.

Como se pudo observar los sistemas 2-DE no están exentos de diversos problemas, teniendo como principales inconvenientes su baja eficiencia en el análisis de proteínas hidrofóbicas y en cambio como ventajas principales se pueden mencionar su robustez, su

alta sensibilidad y su capacidad única para analizar proteínas completas en alta resolución mediante espectrometría de masas (MS), que ha permitido la detección de proteínas con mucha mayor velocidad y sensibilidad de lo anteriormente posible (Rabilloud *et al.*, 2010). Sin embargo, ningún método puede resolver todas las proteínas en un proteoma, debido a su gran número e intervalo de concentración dinámica (Issaq y Veenstra, 2008).

## 9. Conclusiones

- Las especies de dinoflagelados *P. lima*, *P. minimum* y *P. rhathymum* producen compuestos capaces de provocar mortalidades en juveniles de *C. gigas*.
- La exposición de *C. gigas* a varias concentración células completas de tres especies de *Prorocentrum* (celular) y a dos tipos de extractos de las mismas (EA y EO) no influye de manera estadísticamente significativa en la mortalidad, siendo el tiempo de exposición el único factor el que influye en la mortalidad.
- En general, el efecto ocasionado en la expresión de proteínas de juveniles de *C. gigas* por la exposición a células completas y extractos acuosos de *P. lima* y *P. minimum* es la sobre-expresión, mientras que *P. rhathymum* provoca una regulación negativa (subexpresión).
- Los extractos orgánicos de *P. lima* y *P. rhathymum* ocasionan una sobre-expresión de las proteínas en juveniles de *C. gigas*, y el extracto de *P. minimum* provoca una regulación negativa.

- Las funciones biológicas de las proteínas que son afectadas en *C. gigas* por la exposición a células completas y extractos de *P. lima*, *P. minimum* y *P. rhathymum* son:

CC

Propiedades de la concha  
 Sistema inmune  
 Estrés oxidativo  
 Actividad del citoesqueleto

EA

Estrés oxidativo  
 Actividad del citoesqueleto  
 Sistema inmune

EO

Propiedades de la concha  
 Actividad del citoesqueleto  
 Respuesta a estrés  
 Síntesis de proteínas

- La exposición de *C. gigas* a cada una de las especies de *Prorocentrum*, simulando condiciones ambientales, ocasionó: sobre-expresión de proteínas con las células mayor (*P. lima*) y menor toxicidad (*P. rhathymum*) y una sub-expresión con *P. minimum* (toxicidad no comprobada), afectando significativamente diversas funciones biológicas de las proteínas.
- La exposición de juveniles de *C. gigas* al extracto acuoso (moléculas pequeñas, altamente solubles en agua) demostró tener un bajo efecto en las funciones biológicas de las proteínas analizadas.
- El extracto orgánico formado principalmente por toxinas diarreicas (ácido okadaico), demostró tener un fuerte efecto en las funciones biológicas al promover la sobre-expresión de proteínas con la especie de mayor toxicidad (*P. lima*), y

provocando un efecto represor (sub-expresión) con la especie de menor toxicidad (*P. rhathymum*).

- Se comprobó que la exposición de *C. gigas* a microalgas del género *Prorocentrum* causa alteraciones fisiológicas e histológicas (signos) que tienen su origen en la alteración del metabolismo normal de las ostras al modificar los patrones de expresión de proteínas involucradas en procesos vitales como: la respuesta a estrés y procesos de desintoxicación celular, la respuesta inmune, funciones de contractilidad y motilidad, y síntesis de proteínas, entre otros.
- Aunque ningún método puede resolver todas las proteínas en un proteoma debido a su gran número e intervalo de concentración dinámica, en este estudio la aplicación de la técnica de electroforesis 2D generó información relevante que permitió identificar de manera clara algunos procesos celulares vitales que se ven afectados por la exposición de ostiones juveniles (edad de mayor susceptibilidad en el medio natural) a microalgas y algunas de sus fracciones.
- La información generada en este estudio permite el planteamiento de nuevos bioensayos y la generación de nuevas herramientas analíticas, mas específicas, que permitan el seguimiento, caracterización y dilucidación de algunos de los principales efectos de los fenómenos de marea roja en moluscos bivalvos en edades tempranas.

## 10. Literatura citada

- Addadi L, D. Joester, F. Nudelman, S. Weiner. 2006. Mollusk shell formation: A source of new concepts for understanding biomineralization processes. *Chem Eur J.* 12:980-987.
- Aligizaki, K., G. Nikolaidis, P. Katikou, A.D. Baxevanis, T.J. Abatzopoulos. 2009. Potentially toxic epiphytic *Prorocentrum* (Dinophyceae) species in Greek coastal waters. *Harmful Algae.* 8:299-311.
- Alonso-Rodríguez, R. F. Páez-Osuna. 2003. Nutrients, phytoplankton and harmful algal blooms in Shrimp Culture Ponds: A Review with Special Reference to the Situation in the Gulf of California. *Aquaculture.* 219:317-336.
- Apostolopoulos, J., R.L. Sparrow, J.L. Mcleod, F.M. Collier, P.K. Darcy, H.R. Slater, C. Ngu, C.C. Gregorio-King, M.A. Kirkland. 2001. Identification and Characterization of a Novel Family of Mammalian Ependymin-Related Proteins (MERPs) in Hematopoietic, Nonhematopoietic, and Malignant Tissues. *DNA Cell Biol.* 20:625-35.
- Appenzeller-Herzog, C., L. Ellgaard. 2008. The human PDI family: versatility packed into a single fold. *Biochim Biophys Acta.* 1783(4):535-548.
- Apraiz, I., J. Mi, S. Cristobal. 2006. Identification of proteomic signatures of exposure to marine pollutants in mussels (*Mytilus edulis*). *Mol Cell Proteomics.* 5:1274-1285.
- Arredondo, V.B.O., C.J.S. Band. 2000. Aislamiento mantenimiento y cultivo de microalgas nocivas. Manual de curso de cultivos. CIBNOR. La Paz Baja California. 26 p.
- Bailey, K. 1948. Tropomyosin: a new asymmetric protein component of the muscle fibril. *Biochem J.* 43:271-278.
- Balech, E. 1988. Los dinoflagelados del Atlántico sudoccidental. Publicaciones especiales Instituto Español de Oceanografía, Madrid, 1:1-219.
- Bao, Y, L. Li, Q. Wu, G. Zhang. 2008. Cloning, characterization, and expression analysis of extracellular copper/zinc superoxide dismutase gene from bay scallop *Argopecten irradians*. *Fish Shellfish Immunol.* 27:17-25.
- Batistič, O., J. Kudla. 2012. Analysis of calcium signaling pathways in plants. *Biochim Biophys Acta.* 1820:1283-1293.

- Becerril, A. 2000. Estudio taxonómico de algunos dinoflagelados potencialmente tóxicos en el Caribe mexicano. Tesis de Maestría, Fac. Ciencias, UNAM. México, D.F.
- Beninger, P.G., P. Decottignies, Y. Rince. 2004. Localization of qualitative particle selection sites in the heterorhabdic filibranch *Pecten maximus* (Bivalvia: Pectinidae). *Mar Ecol Prog Ser.* 275:163-173.
- Bjørnstad, A., B.K. Larsen, A. Skadsheim, M.B. Jones, O.K. Andersen. 2006. The potential of ecotoxicoproteomics in environmental monitoring: biomarker profiling in mussel plasma using proteinchip array technology. *J Toxicol Environ. Health.* 69:77-96.
- Blanchard, M., J. Pechenik, E. Giudicelli, J. Connan, R. Robert. 2008. Competition for food in the larvae of two marine molluscs, *Crepidula fornicata* and *Crassostrea gigas*. *Aquatic Living Resources.* 21:197-205.
- Boudsocq, M. Y J. Sheen. 2013. CDPKs in immune and stress signaling. *Trends Plant Sci.* 18:30-40.
- Boutet, I., A. Tanguy, D. Moraga. 2004. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene.* 329:147-57.
- Bradley, B.P., E.A. Shrader, D.G. Kimmel, J.C. Meiller. 2002. Protein expression signatures: an application of proteomics. *Mar Environ Res.* 54:373-377.
- Bricelj, M.V., E. Shumway. 1998. Paralytic shellfish toxins in bivalve mollusks: Occurrence, transfer kinetics, and biotransformation. *Rev Fish Sci.* 6:315-383.
- Brissoni, B., L. Agostini, M. Kropf, F. Martinon, V. Swoboda, S. Lippens, H. Everett, N. Aebi, S. Janssens, E. Meylan, M. Felberbaum-Corti, H. Hirling, J. Gruenberg, J. Tschopp, K. Burns. 2006. Intracellular trafficking of interleukin-1 receptor I requires Tollip. *Curr Biol.* 16:2265-2270.
- Brömme, D., 2001. Papain-like cysteine proteases. En: John Wiley y Sons (Eds), *Current Protocols in Protein Science.* Chapter 21:2102-2121.
- Bush, D.S. 1995. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 26:953-967.
- Cáceres-Martínez, J., R. Vásquez-Yeomans, A. García-Ortega. 2004. Episodios de mortalidad del ostión japonés *Crassostrea gigas* en Baja California y sus relaciones con bacterias. *Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico.* 2:1-3.

- Caillaud, A., P. de la Iglesia, M. Campas, L. Elandaloussi, M. Fernández, N. Mohammad-Noor, K. Andree, J. Diogene. 2010. Evidence of okadaic acid production in a cultured strain of the marine dinoflagellate *Prorocentrum rhathymum* from Malaysia. *Toxicon*. 55:633-637.
- Carmichael, W.W., P.R. Gorham. 1981. The mosaic nature of toxic blooms of cyanobacteria, En: B.C. Nicholson, M.D. Burch. 2001. Evaluation of analytical methods for detection and quantification of cyanotoxins in relation to Australian drinking water guidelines. ISBN. Australia, 64 pp
- Carmody, E.P., K.J. James, S.S. Kelly. 1995. Diarrhetic shellfish poisoning: evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay methods for determination of dinophysistoxin-2. *Food Biological Contaminants*. 78:1403-1408.
- Castillo-Rodríguez, Z.G., A. García-Cubas. 1986. Taxonomía y anatomía de las ostras en las costas de México. *Inst. Cienc del Mar y Limnol. UNAM*. 13:249-314.
- Chao, E., H.W. Kim, D.L. Mykles. 2010. Cloning and tissue expression of eleven troponin-C isoforms in the American lobster, *Homarus americanus*. *Comp Biochem Physiol Biochem Mol Biol*. 157:88-101.
- Chávez-Villalba, J., A. Hernández-Ibarra, M.R. López-Tapia, J.M. Mazón-Suástegui. 2008. Prospective culture of the Cortez oyster *Crassostrea corteziensis* from northwestern Mexico: growth, gametogenic activity, and condition index. *J Shell Res*. 27:711-720.
- Chávez-Villalba, J., R. Villelas-Ávila, C. Cáceres-Martínez. 2007. Reproduction, condition and mortality of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Sonora, México. *Aquaculture research*. 38:268-278
- Chen, G., C. Zhang, C. Li., C. Wang, Z. Xu, P. Yan. 2011. Haemocyte protein expression profiling of scallop *Chlamys farreri* response to acute viral necrosis virus (AVNV) infection. *Dev Comp Immunol*. 35:1135-1145.
- Cheney, D.P., B.F. Macdonald, R. Elston. 2000. Summer mortality of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg): initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington, 1998. *J Shell Res*. 19:353-359.

- Cheng, A., T. Schilling, W. Mu, P.M. Genever. 2010. Cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing 2 (CRISLD2) is a novel mediator of Wnt signaling in human mesenchymal stem cells. 37th European Symposium on Calcified Tissues, 47:S63
- Cheng, A., T. Schilling, W. Mu, P.M. Genever. 2010. Cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing 2 (CRISLD2) is a novel mediator of Wnt signaling in human mesenchymal stem cells. *Bone*. 47:63.
- Chora, S., B. McDonagh, D. Sheehan, M. Starita-Geribaldi, M. Romeo, M.J. Bebianno. 2008. Ubiquitination and carbonylation as markers of oxidative-stress in *Ruditapes decussatus*. *Mar Environ Res*. 66:95-97.
- Chora, S., M. Starita-Geribaldi, J-M. Guignonis, M. Samson, M. Romeo, M.J. Bebianno. 2009. Effect of cadmium in the clam *Ruditapes decussatus* assessed by proteomic analysis. *Aquat Toxicol (Amst)*. 94:300-308.
- Chwieralski, C.E., T.Welte. F. Bühling. 2006. Cathepsin-regulated apoptosis. *Apoptosis*. 11(2):143-149.
- Cognie, B., L. Barille, G. Masse, P. G. Beninger. 2003. Selection and processing of large suspended algae in the oyster *Crassostrea gigas*. *Mar Ecol Prog. Ser.* 250:145-152.
- Corporea, C., G. Vanderplancka, M. Boulaisa, M. Suqueta, C. Quérea, P. Boudrya, A. Huveta, S. Madecb. 2012. Proteomic identification of quality factors for oocytes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J Proteomics*. 75:5554-5563
- Cortés-Altamirano, R. 1998. Mareas rojas. *AGT Editores*. México
- Cortés-Altamirano, R., A. Sierra-Beltrán, R. Barraza-Guardado. 2004. Mortandad de peces debido al microalgas nocivas y toxicas: cinco casos de marea roja en la costa continental del Golfo de California (2003-2004). *COASTFISH*. 1ª Conferencia de Pesquerías Costeras en América Latina y el Caribe, 79-90.
- Cortés-Altamirano, R., A.P. Sierra-Beltrán. 2003. Morphology and taxonomy of *Prorocentrum mexicanum* and reinstatement of *Prorocentrum rhathymum* (Dinophyceae). *J Phycol.* 39:22-225.
- Coutu, D.L., J.H. Wu, A. Monette, G.E. Rivard, M.D. Blostein, J. Galipeau. 2008. Periostin, a member of a novel family of vitamin k-dependent proteins, is expressed by mesenchymal stromal cells. *J Biol Chem*. 283:17991-18001.

- Cristofolletti, P.T., A.F. Ribeiro, W.R. Terra. 2005. The cathepsin L-like proteinases from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae: sequence, properties, immunocytochemical localization and function. *Insect Biochem Mol Biol.* 35:883-901
- Dailianis, S., E. Patetsini, M. Kaloyianni. 2009. The role of signalling molecules on actin glutathionylation and protein carbonylation induced by cadmium in haemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lmk). *J Exp Biol.* 212:3612-3620.
- de Carvalho, G. P., P. R. Cavalcante, A. C. de Castro, M.O. Rojas. 2000. Preliminary assessment of heavy metal levels in *Mytella falcata* (Bivalvia, Mytilidae) from Bacanga River estuary, Sao Luis, State of Maranhão, Northeastern Brazil. *Rev. Bras. Biol.* 60:11-16
- de las Heras, S.S. 2009. Efecto de dinoflagelados tóxicos del género *prorocentrum* (Dinophyceae) en el ostión japonés *crassostrea gigas* (thunberg, 1793). Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma De Baja California Sur, La Paz, Baja California Sur, México.
- De León, L. 2002. Floraciones de cianobacterias en aguas continentales del Uruguay: causas y consecuencias, *In: Perfil Ambiental del Uruguay 2002*, Domínguez, A. y R. G. Prieto (Eds.), Nordan-Comunidad, Montevideo, 28-37.
- Defosse, J.M., A.J.S. Hawkins. 1997. Selective feeding in shellfish: size-dependent rejection of large particles within pseudofaeces from *Mytilus edulis*, *Ruditapes philippinarum* and *Tapes decussatus*. *Mar Biol.* 129:139-147.
- Dégremont, L., E. Bédier, P. Soletchnik, M. Ropert, A. Huvet, J. Moal, J.F. Samain, P. Boudry 2005. Relative importance of family, site, and field placement timing on survival, growth and yield of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 249:213-229.
- Delgado, G., G. Popowski, M. Pombo. 2002. Nuevos registros de dinoflagelados tóxicos epibentónicos en Cuba. *Rev Invest Mar.* 23:229-232.
- Devier, M. H., S. Augagneur, H. Budzinski, K. Le Menach, P. Mora, J.F. Narbonne, P. Garrigues. 2005. One-year monitoring survey of organic compounds (PAHs, PCBs, TBT), heavy metals and biomarkers in blue mussels from the Arcachon Bay, France. *J Environ Monit.* 7: 224-240.

- Dheilly, M.N., C. Lelong, A. Huvet, P. Favrel. 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.
- Dhe-Paganon, S., E.D. Werner, Y. Chi, S.E. Shoelson. 2002. Structure of the Globular Tail of Nuclear Lamin. *J Biol Chem*. 277(20):17381-17384.
- Di Bella, M.A., M.A. Carbone, M. D'Amato, R. Alessandro, R. De Leo. 2009. The identification and localization of two intermediate filament proteins in the tunic of *Styela plicata* (Tunicata, Styelidae). *Tissue and Cell* 41:381-389
- Díaz, N., A. Sfeir, K. Mansilla, M. Seguel, J. Córdova. 2007. Un nuevo método para detectar veneno diarreico en mariscos aún en presencia de otras ficotoxinas. *Ciencia y Tecnología del Mar*, 30:1-10.
- Dodge, J.D. 1982. Marine dinoflagellates of the British Isles. University of London, Inglaterra, 303 pp.
- Domínguez, R., K.C. Holmes. 2011. Actin Structure and Function. *Annu. Rev. Biophys.* 40:169-186.
- Dowling, V., B. McDonagh, E.M. Cotter, N. O'Brien, F. van Pelt, J. O'Halloran, D. Sheehan. 2006. Two-dimensional electrophoresis analysis of glutathione affinity-selected proteins from the clam *Tapes semidecussatus*: Evidence for tissue-specific expression of redox. *Comp Biochem Physiol part D Genomics Proteomics*. 1:267-272
- Draisci, R., L. Giannetti, L. Lucentini, C. Marchiafava, K.L. James, A.G. Bishop, B.M. Healy, S.S Kelly. 1998. Isolation of a new okadaic acid analogue from phytoplankton implicated in diarrhetic shellfish poisoning. *J Chromatogr*. 798:137-145.
- Dutertre, D., L. Barillé, J. Haure, B. Cognie. 2007. Functional responses associated with pallial organ variations in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). *J. of Exp. Mar. Biol. and Ecol.* 352:139-151.
- Eble, A.F., R. Scro. 1996. General anatomy. En: Kennedy V.S., Newell, R.I.E., Eble. A.F. (eds.). *The Eastern Oyster: Crassostrea Virginica*. Editorial University of Maryland Sea Grant Publications; 2nd edición. 734p.

- Eckelbarger, K.J., C.V. Davis. 1996. Ultrastructure of the gonad and gametogenesis in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. I. Ovary and oogenesis. *Marine Biology* 127:79-87.
- Ellerman, D.A., D.G. Myles, P. Primakoff. 2006. A role for sperm surface protein disulfide isomerase activity in gamete fusion: evidence for the participation of ERp57. *Dev Cell*. 10(6):831-837.
- Estrada, A.N., N. Lagos, C. García, A.N. Maeda-Martínez, F. Ascencio. 2007. Effects of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* on uptake and fate of paralytic shellfish poisons in the Pacific giant lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus*. *Mar Biol*. 151:1205-1214.
- Fang, Z. Q., R. Y. Cheung, M. H. Wong. 2003. Heavy metals in oysters, mussels and clams collected from coastal sites along the Pearl River Delta, South China. *J Environ Sci*. 15:9-24.
- FAO. 2006. Programa de información de especies acuáticas *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), En: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online].
- FAO. 2009. The State of World Fisheries and Aquaculture. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO, Roma.
- Farah, C.S., F.C., Reinach. 1995. The troponin complex and regulation of muscle contraction. *FASEB J*. 9:755-767.
- Farrell, P.H.O. 1975. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. *J Biol Chem*. 250:4007-4021.
- Faust, M.A. 1991. Morphology of ciguatera-causing *Prorocentrum lima* (Pyrrophyta) from widely differing sites. *J Phycol*. 27:642-648.
- Faust, M.A., J. Larsen, O. Moestrup. 1999. Potentially toxic phytoplankton. 3. Genus *Prorocentrum* (Dinophyceae), ICES Identification Leaflets for Plankton. Leaflet. 184:1-23.
- Fine, R.E., A.L. Blitz. 1975. A chemical composition of tropomyosin from muscle and non-muscle tissues. *J Mol Biol*. 95:447-454.

- Fortunati, D., S. Reppe, Å.K. Fjeldheim, M. Nielsen, V.T. Gautvik, K.M. Gautvik. 2010. Periostin is a collagen associated bone matrix protein regulated by parathyroid hormone. *Matrix Biol.* 29:594-601.
- Fott, B. 1971. *Algenkunde*, 2. Aufl. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, En: Skulberg, O.M., W.W. Carmichael, G.A. Codd, R. Skulber. 1993. Cap. 9. Taxonomy of toxic cyanophyceae (cyanobacteria). 145-164.
- Fromherz, S., Ag. Szent-Gyorgyit. 1995. Role of essential light chain EF hand domains in calcium binding and regulation of scallop myosin. *Proc Natl Acad Sci.* 92:652-7656
- Fuchs, E. 1994. Intermediate filaments: Structure, Dynamics, Function, and Disease. *Annu Rev Biochem.* 63:345-82
- Funkelstein, L., M. Beinfeld, A. Minokadeh, J. Zadina, V. Hook. 2010. Unique biological functions of cathepsin L in secretory vesicles for biosynthesis of neuropeptides. *Neuropeptides.* 44:457-466.
- Funkelstein, L., T. Toneff, S.R. Hwang, T. Reinheckel, C. Peters, V.Y.H. Hook. 2008. Cathepsin L participates in the production of neuropeptide Y in secretory vesicles, demonstrated by protease gene knockout and expression. *J. Neurochem.* 106:384-391.
- Ganss, B., W. Hoffmann. 1993. Calcium binding to sialic acids and its effect on the conformation of ependymins. *Eur J Biochem.* 217:275-280.
- Ganss, B., W. Hoffmann. 2009. Calcium-induced conformational transition of trout ependymins monitored by tryptophan fluorescence. *Open Biochem J.* 3:14-17.
- Gárate-Lizárraga, I., B. Pérez-Cruz, J. Díaz-Ortíz, C. Band-Schmidt. 2008. Microalgas y biotoxinas marinas en las costas mexicanas. *Conversus.* 9:22-26.
- Gárate-Lizárraga, I., M.L. Hernández-Orozco, C. Band-Schmidt, G. Serrano-Casillas. 2001. Red tides a long the coasts of Baja California Sur, México (1984-2001). *Oceánides.* 16:127-134.
- Gárate-Lizárraga, I., M.S. Muñetón-Gómez. 2008. Bloom of *Peridinium quinquecorne* Abé in la Ensenada de La Paz, Golf of California (July 2003). *Acta Botánica Mexicana.* 83:33-47.

- Gayoso, A.M., S. Dover, S. Morton, M. Busman, P. Moeller, V.K. Fulco, A.L. Maranda. 2002. Diarrhetic shellfish poisoning associated with *Prorocentrum lima* (Dinophyceae) in Patagonian Gulfs (Argentina). *J Shell Res.* 21:461-463.
- Gerssen, A., I. Pol-Hofstad, M. Poelman, P.J. Mulder, H.J. van den Top, J. de Boer. 2010. Marine toxins: chemistry, toxicity, occurrence and detection, with special reference to the Dutch situation, *Toxins.* 2:878-904.
- Gibbs, G.M., K. Roelants, M. K. O'Bryan. 2008. The CAP Superfamily: Cysteine-Rich Secretory Proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-Related 1 Proteins-Roles in Reproduction, Cancer, and Immune Defense. *Endocrine Reviews.* 29(7):865-897.
- Gillan, L., D. Matei, D.A. Fishman, C. S. Gerbin, B.Y. Karlan, D.D. Chang. 2002. Periostin Secreted by Epithelial Ovarian Carcinoma Is a Ligand for V3 and V5 Integrins and Promotes Cell Motility<sup>1</sup>. *Cancer Res.* 62:5358-5364.
- Girón-Pérez, M.I. 2010. Relationships between innate immunity in bivalve molluscs and environmental pollution. *Invertebrate Survival Journal.* 7(2):149-156.
- Gomiero A., D.M. Pampanin, A. Bjørnstad, B.K. Larsen, F. Provan, E. Lyng, O.K. Andersen. 2006. An ecotoxicoproteomic approach (SELDI-TOF mass spectrometry) to biomarker discovery in crab exposed to pollutants under laboratory conditions. *Aquat Toxicol.*78:34-41.
- Goslin, E. 2003. *Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture.* Editorial Blackwell Publishing. Primera Edición. Gran Bretaña. 456p.
- Gouletquer, P., P. Soletchnik, O. Le Moine, D. Razet, P. Gearion, N. Faury. 1998. Summer mortality of the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* in the Bay of Marennes-Oléron (France). International council for the exploration of the sea. ICES statutory meeting, copenhagen journées conchylicoles ifremer. 1-21.
- Green, K.J, M. Böhringer, T. Gocken, J.C. Jones. 2005. Intermediate filament associated proteins. *Adv Protein Chem.* 70:43-202
- Green, T.J., T.J. Dixon, E. Devic, R.D. Adlard, A.C. Barnes. 2009. Differential expression of genes encoding anti-oxidant enzymes in Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata* (Gould) selected for disease resistance. *Fish Shellfish Immunol.* 26:799-810.

- Gromov, S.P., E.J. Celis. 2000. From Genomics to Proteomics. *Mol. Biology*. 34(4):508-520.
- Gueguen, Y., J.P. Cadoret., D. Flament, C. Barreau-Roumiguière, A.L. Girardot, J. Garnier A. Hoareau, E. Bachère, J.M. Escoubas. 2003. Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene*. 303:139-145.
- Guillard, R.R.L., J.H. Ryther. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can J Microbiol*. 8:229-239.
- Guo, X., D. Hedgecock, W.K. Hershberger, K. Cooper, S.K. Jr. Allen. 1998. Genetic determinants of protandric sex in the pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Evolution*. 52:394-402.
- Gygi, S. P., G. L. Corthals, Y. Zhang, Y. Rochon, R. Aebersold. 2000. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci*. 97(17):9390-9395
- Hackett, J.D., D.M. Anderson, D.L. Erdner, D. Bhattacharya. 2004. Dinoflagellates: a remarkable evolutionary experiment. *Am. J. Bot.* 91:1523-1534.
- Harper, J.F., M.R. Sussman, G.E. Schaller, C. Putnam-Evans, H. Charbonneau, A.C. Harmon. 1991. A calcium-dependent protein kinase with a regulatory domain similar to calmodulin. *Science*. 252:951-954.
- Hayano, T., M. Kikuchi. 1995. Cloning and sequencing of the cDNA encoding human P5. *Gene*. 164:377-378.
- Hedgecock, D., M.P. Gaffney, P. Gouletquer, X. Guo, K. Reece, G.W. Warr. 2005. The case for sequencing the Pacific oyster genome. *J. Shellfish Res.* 24(2)429-441.
- Heil, C.A., P.M. Gilbert, C. Fan. 2005. *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller: A review of a harmful algal bloom species of growing worldwide importance. *Harmful Algae*. 4:449-470.
- Helm, M.M., N. Bourne. 2004. Hatchery culture of bivalves. A practical manual. FAO, fisheries technical paper. Rome. 177pp.
- Heredia-Tapia, A., B.O. Arredondo-Vega, E.J. Nuñez-Vázquez, T. Yasumoto, M. Ysuda, J.L. Ochoa. 2002. Isolation of *Prorocentrum lima* (Syn. *Exuviella lima*) and diarrhetic

- shellfish poisoning (DSP) risk assessment in the Gulf of California, Mexico. *Toxicon*. 40:1121-1127.
- Hernández-Becerril, D.U., Cortes-Altamirano, R., R.R. Alonso. 2000. The dinoflagellate genus *Prorocentrum* along the coasts of the Mexican Pacific. *Hydrobiologia*. 418:111-21.
- Hernández-Orozco, M.L., I. Gárate-Lizárraga. 2006. Síndrome de envenenamiento paralizante por consumo de moluscos. *Rev Biomed*. 17:45-60.
- Herrmann, H. y S.V. Strelkov. 2011. History and phylogeny of intermediate filaments: Now in insects. *BMC Biol*. 9:16.
- Hietanen, B., I. Sunila, R. Kristoffersson. 1988. Toxic effects of zinc on the common mussel *Mytilus edulis* L. *Ann. Zool Fennici*. 25:349-352.
- Hoffmann, W., H. Schwarz. 1996. Ependymins: Meningeal-derived extracellular matrix proteins at the blood-brain barrier. *Int Rev Cytol*. 165:121-158.
- Hoffmann, W. 1994. Ependymins and their potential role in neuroplasticity and regeneration: Calcium-binding meningeal glycoproteins of the cerebrospinal fluid and extracellular matrix. *Int J Biochem*. 26:607-619.
- Hogstrand, C., S. Balesaria, C.N. Glover. 2002. Application of genomics and proteomics for study of the integrated response to zinc exposure in a non-model fish species, the rainbow trout. *Comp Biochem. Physiol*. 133:523-35.
- Hook, V., L. Funkelstein, J. Wegrzyn, S. Bark, M. Kindy, G. Hook. 2012. Cysteine Cathepsins in the secretory vesicle produce active peptides: Cathepsin L generates peptide neurotransmitters and cathepsin B produces beta-amyloid of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Act*. 1824:89-104
- Hooper, S.L., K.H. Hobbs, J.B. Thuma. 2008. Invertebrate muscles: Thin and thick filament structure; molecular basis of contraction and its regulation, catch and asynchronous muscle. *Prog Neurobiol*. 86:72-127.
- Horiuchi, K., N. Amizuka, S. Takeshita, H. Takamatsu, M. Katsuura, H. Ozawa, Y. Toyama, L.F. Bonewald, A. Kudo. 1999. Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and

- increased expression by transforming growth factor beta. *J Bone Miner Res.* 14:1239-1249.
- Houdusse, A., C. Cohen. 1996. Structure of the regulatory domain of scallop myosin at 2 °A resolution: implications for regulation. *Structure.* 4:21-32.
- Hrabak, E.M., C.W. Chan, M. Gribskov, J.F. Harper, J.H. Choi, N. Halford, J. Kudla, S. Luan, H.G. Nimmo, M.R. Sussman, M. Thomas, K. Walker-Simmons, J.K. Zhu, A.C. Harmon. 2003. The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol.* 132:666-680.
- Hu, K.J., P.C. Leung. 2004. Shrimp cathepsin L encoded by an intronless gene has predominant expression in hepatopancreas, and occurs in the nucleus of oocyte. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 137:21-33.
- Huan, P., H. Wang, B. Dong, B. Liu. 2012. Identification of differentially expressed proteins involved in the early larval development of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J Proteomics.* 75(13):3855-65.
- Huang, X., C. Fang, Y. Guo, H. Huang. 2011. Differential protein expression of kidney tissue in the scallop *Patinopecten yessoensis* under acute cadmium stress. *Ecotox Environ Safe.* 74:1232-1237.
- Huvet, A., A. Herpin, L. De'gremont, Y. Labreuche, J.F. Samain, C. Cunningham. 2004. The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene.* 343:211-20.
- Issaq, H., T.Veenstra. (2008). Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): advances and perspectives. *BioTechniques,* 44(5):697-698.
- Itoh, N., Q.G. Xue, K.L. Schey, Y. Li, R.K. Cooper, J.F. La Peyre. 2011. Characterization of the major plasma protein of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and a proposed role in host defense. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 158:9-22.
- Jeeps, C.M., A. Silcox, B.Lloyd, B.E. Clayton. 1986. Dihydropteridine reductase activity in dried blood spots: effects of aging and senile dementia of the Alzheimer type. *J Clin Pathol.* 39:199-203.

- Jenny, M.J., A.H. Ringwood, E.R. Lacy, A.J. Lewitus, J.W. Kempton, P.S.Gross, G.W. Warr, R.W. Chapman. 2002. Potential indicators of stress response identified by expressed sequence tag analysis of hemocytes and embryos from the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Mar Biotechnol* 4:81-9.
- Jonsson, H., D. Schiedek, B.E. Grøsvik, A. Goksøyr. 2006. Protein responses in blue mussels (*Mytilus edulis*) exposed to organic pollutants: A combined CYP-antibody/proteomic approach. *Aquat. Toxicol. (Amst)*. 78:49-56.
- Jorgensen, B.C. 1996. Bivalves filter feeding revisited. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 142:287-302.
- Kahn, P. 1995. From genome to proteome: looking at a cell's proteins. *Science* 270: 369-370.
- Kang, R.S., C.M. Daniels, S.A. Francis, S.C. Shih, W.J Salerno, L. Hicke, I. Radhakrishnan. 2003. Solution Structure of a CUE-Ubiquitin Complex Reveals a Conserved Mode of Ubiquitin Binding. *Cell*. 113(5):621-630.
- Kennedy, S.V. 1996. Biology of larvae and spat. En: Kennedy V.S., Newell, R.I.E., Eble. A.F. (eds.). *The Eastern Oyster: Crassostrea Virginica*. Editorial University of Maryland Sea Grant Publications; 2nd edición. 734p.
- Kii, I., N. Amizuka, L. Minqi, S. Kitajima, Y. Saga, A. Kudo. 2006. Periostin is an extracellular matrix protein required for eruption of incisors in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 342:766-772.
- Kikuchi, M., E. Doi, I. Tsujimoto, T. Horibe, Y. Tsujimoto. 2002. Functional analysis of human P5, a protein disulfide isomerase homologue. *J Biochem*. 132:451-455.
- King, T.P., 1996. Immunochemical studies of stinging insect venom allergens. *Toxicon*. 34:1455-1458.
- Knigge, T., T. Monsinjon, O.K. Andersen. 2004. Surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry approach to biomarker discovery in blue mussels (*Mytilus edulis*) exposed to polyaromatic hydrocarbons and heavy metals under field conditions. *Proteomics*. 4:2722-2727.
- Koppers, A.J., T. Reddy, M.K O'Bryan. 2011. The role of cysteine-rich secretory proteins in male fertility. *Asian J Androl*. 13:111-117

- Kota, KP, S.R. Wagner, E. Huerta, J.M. Underwood, J.A. Nickerson. 2008. Binding of ATP to UAP56 is necessary for mRNA export. *J Cell Sci.* 121(9):1526-37.
- Kudo, A. Periostin in fibrillogenesis for tissue regeneration: periostin actions inside and outside the cell. *Cell Mol Life Sci.* 68:3201-3207.
- Kumar, V.S., E. O'Neill-Hennessey, L. Reshetnikova, J.H. Brown, H. Robinson, A.G. Szent-Gyorgyi, C. Cohen. 2011. Crystal Structure of a Phosphorylated Light Chain Domain of Scallop Smooth-Muscle Myosin. *Biophysical J.* 101: 2185–2189.
- Landsberg, H.J. 2002. The Effects of Harmful Algal Blooms on Aquatic Organisms. *Reviews in Fisheries Science.* 10(2):113-390.
- Leffler, M., J. Greer. 1991. The ecology of *Crassostrea gigas* in Australia, New Zealand, France and Washington State. Maryland sea grant college publisher. EU. UM-SGTS-92-07.
- Leimgruber, R.M. 2005. Extraction and Solubilization of Proteins for Proteomic Studies. Proteins. En: Walker, J.M. *The Proteomics Protocols Handbook.* USA. 988p.
- Leung, P.T., Y. Wang, S.S. Mak, W.C. Ng, K.M. Leung. 2011. Differential proteomic responses in hepatopancreas and adductor muscles of the green-lipped mussel *Perna viridis* to stresses induced by cadmium and hydrogen peroxide. *Aquatic Toxicology* 105(1-2):49-61.
- Li, A.R., J. Lee, D. Borek, Z. Otwinowski, G.F. Tibbits, M. Paetzel. 2011. Crystal structure of cardiac troponin c regulatory domain in complex with cadmium and deoxycholic acid reveals novel conformation. *J Mol Biol.* 413:699-711
- Li, X., M. Guo, J. Fan, W. Tang, D. Wang, H. Ge, H. Rong, M. Teng, L. Niu, Q. Liu, Q. Hao. 2006. Crystal structure of 3-hydroxyanthranilic acid 3,4-dioxygenase from *Saccharomyces cerevisiae*: A special subgroup of the type III extradiol dioxygenases. *Protein Sci.* 15:761-773.
- Li, Y., G. Siddiqui, G.H. Wikfors. 2010. Non-lethal determination of sex and reproductive condition of Eastern oysters *Crassostrea virginica* Gmelin using protein profiles of hemolymph by Proteinchip® and SELDI-TOF-MS technology. *Aquaculture.* 309:258-264.

- Liao, J.-L., Y.J. Huang. 2011. Evaluation of protocols used in 2-d electrophoresis for proteome analysis of young rice caryopsis. *Genomics, proteomics bioinformatics*, 9(6):229-237
- Licea, S., M.E. Zamudio, R. Luna, J. Soto. 2004. Free-living dinoflagellates in the southern Gulf of Mexico: report of data (1979-2002). *Phycol Res.* 52:419-428.
- Liese, A., T. Romeis. 2012. Biochemical regulation of in vivo function of plant calcium-dependent protein kinases (CDPK). *Biochim Biophys Acta.* 167:8
- Linder, P. y E. Jankowsky. 2011. From unwinding to clamping the DEAD box RNA helicase family. *Nature Reviews Molecular Cell Biol.* 12:505-516.
- Litvin, J., A. Blagg, A. Mu, S. Matiwala, M. Montgomery, R. Berretta, S. Houser, K. Margulies. 2006. Periostin and periostin-like factor in the human heart: possible therapeutic targets. *Cardiovasc Pathol.* 15:24-32.
- López J.L., 2005. Role of proteomics in taxonomy: The *Mytilus* complex as a model of study. *J Chromatogr.*, 815:261-274.
- López, J.L., A. Marina, G. Álvarez, J. Vázquez. 2002-b. Application of proteomics to the fast identification of species-specific peptides from marine species. *Proteomics.* 2:1658–1665
- López, J.L., A. Marina, J. Vázquez, G. Álvarez. 2002-a. A proteomic approach to the study of the marine mussels *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. *Mar Biol.* 141:217-223
- López, J.L., E. Mosquera, J. Fuentes, A. Marina, J. Vázquez, G. Álvarez. 2001. Two-dimensional gel electrophoresis of *Mytilus galloprovincialis*: differences in protein expression between intertidal and cultured mussels. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 224:149-156.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193:265-275.
- Manduzio, H., P. Cosette, L. Gricourt, T. Jouenne, C. Lenz, O.K. Andersen, F. Leboulenger, B. Rocher. 2005. Proteome modifications of Blue mussel (*Mytilus edulis* L.) gills as an effect of water pollution. *Proteomics.* 5:4958-4963.
- Marshall, H.G., 1997, Toxic phytoplankton blooms: how common are species that may produce toxic blooms in Chesapeake Bay?. *Idee ekologiczne, ser. szkice, poznań.* 10:141-149.

- Meiller, J.C., B.P. Bradley. 2002. Zinc concentration effect at the organismal, cellular and subcellular levels in the eastern oyster. *Mar. Environ Res.* 54:401-404.
- Mencarelli, C., S. Ciolfi, D. Caroti, P. Lupetti, R. Dallai. 2011. Isomin: a novel cytoplasmic intermediate filament protein from an arthropod species. *BMC Biol.* 9:17
- Mi, J., A. Orbea, N. Syme, M. Ahmed, M.P. Cajaraville, S. Cristóbal. 2005. Peroxisomal proteomics, a new tool for risk assessment of peroxisome proliferating pollutants in the marine environment. *Proteomics.* 5:3954-3965.
- Monsinjon, T., O. Ketil, F. Leboulenger, T. Knigge. 2006. Data processing and classification analysis of proteomic changes: a case study of oil pollution in the mussel, *Mytilus edulis*. *Proteome Science.* 4:17
- Monsinjon, T., T. Knigge. 2007. Proteomic applications in ecotoxicology. *Proteomics.* 7:2997-3009.
- Montagnani, C., F. Le Roux, F. Berthe, J.M. Escoubas. 2001. Cg-TIMP, an inducible tissue inhibitor of metalloproteinase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with a potential role in wound healing and defense mechanisms. *FEBS Letters.* 500:64-70
- Moreno, I.M., P. Pereira, S. Franca, A. Cameán. 2004. Toxic cyanobacteria strains isolated from blooms in the Guadiana River (southwestern Spain). *Biol. Res.* 37:405-417.
- Muralidharan, S., E. Thompson, D. Raftos, G. Birch. P.A. Haynes. 2012. Quantitative proteomics of heavy metal stress responses in Sydney rock oysters. *Proteomics.* 12:906-921.
- Nagamune, K., S.N. Moreno, E.N. Chini, L.D. Sibley. 2008. Calcium regulation and signaling in apicomplexan parasites. *Subcell Biochem.* 47:70-81.
- Newell, R.I.E., S.J. Jordan. 1983. Preferential ingestion of organic material by the American oyster *Crassostrea virginica*. *Mar Ecol Prog. Ser.* 13:47-53.
- Nielsen, K.H0., V. Simonsen, K.E. Lind. 1969. Dihydropteridine Reductase A Method for the Measurement of Activity, and Investigations of the Specificity for NADH and NADPH. *European J Biochem.* 9:497-502.
- Nishita, K., H. Tanaka, T. Ojima. 1994. Amino acid sequence of troponin C from scallop striated adductor muscle. *J Biol Chem.* 269:3464-3468.

- Norris, R.A., B. Damon, V. Mironov, V. Kasyanov, A. Ramamurthi, R. Moreno-Rodriguez, T. Trusk, J.D. Potts, R.L. Goodwin, J. Davis, S. Hoffman, X. Wen, Y. Sugi, C.B. Kern, C.H. Mjaatvedt, D.K. Turner, T. Oka, S.J. Conway, J.D. Molkenin, G. Forgacs, R.R. Markwald. 2007. Periostin regulates collagen fibrillogenesis and the biomechanical properties of connective tissues. *J Cell Biochem.* 101:695-711
- Núñez-Vázquez, E.J., I. Garate-Lizárraga, C. Band-Schmidt, A. Cordero-Tapia, D. López-Cortés, F. Hernández-Sandoval, A. Heredia-Tapia, J. Bustillos-Guzmán. 2008. Impacto de las proliferaciones microalgales nocivas en animales silvestres y de cultivo en el golfo de california.
- Oberemm, A., C. Meckert, L. Brandenburger, A. Herzig, Y. Lindner, K. Kalenberg, E. Krause, C. Ittrich, A. Kopp-Schneider, R. Stahlmann, H.B. Richter-Reichhelm, U. Gundert-Remy. 2005. Differential signatures of protein expression in marmoset liver and thymus induced by single-dose TCDD treatment. *Toxicology.* 206:33-48.
- Ochoa, J., E.J. Núñez-Vázquez, J. Saad. 2003. Diferentes términos utilizados para describir las “mareas rojas”. *Rev Biol Trop.* 51:621-628.
- Ochoa, J.L., A. Sánchez-Paz, A Cruz-Villacorta, E.J. Nuñez-Vazquez, A.P. Sierra-Beltrán. 1997. Toxic events in the North Pacific Coastline in Mexico during 1992-1995: origin and impact. *Hidrobiología,* 352:195-200.
- Ochoa, J.L., D.U. Hernández-Becerril, S. Lluch-Cota, B.O. Arredondo-Vega, E. Núñez-Vázquez, A. Heredia-Tapia, J. Pérez-Linares, R. Alonso-Rodríguez. 2002. Marine biotoxins and harmful algal blooms in Mexico`s Pacific littoral. En: Taylor, F. J. R., Trainer, V.L. (Eds.). *Harmful Algal Blooms in the PICES Region of the North Pacific.* PICES Sci. Rep. No. 23. Sidney, British Columbia, 156p.
- Oguro, A., H. Kubota, M. Shimizu, E. Fujita, S. Ishiura, Y. Atomi. 2011. Protective role of the ubiquitin binding protein Tollip against the toxicity of polyglutamine-expansion proteins. *Neuroscience Letters.* 503: 234-239.
- Oh, M., X. Wu, H.S. Kim, J.F. Harper, R.E. Zielinski, S.D. Clouse, S.C.Huber. 2012. CDPKs are dual-specificity protein kinases and tyrosine autophosphorylation attenuates kinase activity. *FEBS Letters.* 586:4070-4075.

- Olsson, B.R., B.P. Bradley, M. Gilek, O. Reimer, J.L. Shepard, M. Tedengren. 2004. Physiological and proteomic responses in *Mytilus edulis* exposed to PCBs and PAHs extracted from Baltic Sea sediments. *Hidrobiología*. 514:15-27.
- Ozawa H., S. Watabe, Y. Ochiai. 2010. Thermostability of striated and smooth adductor muscle tropomyosins from Yesso scallop *Mizuhopecten yessoensis*. *J Biochem*. 147(6):823-832
- Pales-Espinosa, E., D. Hassan, E.J. Ward, E.S. Shumway, B. Allam. 2010(B). Role of Epicellular Molecules in the Selection of Particles by the Blue Mussel, *Mytilus edulis*. *Biol Bull*. 219:50-60.
- Pales-Espinosa, E., L. Barille, B. Allam. 2007. Use of encapsulated live microalgae to investigate pre-ingestive selection in the oyster *Crassostrea gigas*. *J Exp Mar Biol Ecol*. 343:118-126.
- Pales-Espinosa, E., M. Perrigault, E.J.Ward, E.S. Shumway, B. Allam. 2010(A). Microalgal cell surface carbohydrates as recognition sites for particle sorting in suspension-feeding bivalves. *Biol Bull*. 218:75-86.
- Pales-Espinosa, E., M. Perrigault, J. E. Ward, E.S. Shumway, B. Allam. 2009. Lectins associated with the feeding organs of the oyster *Crassostrea virginica* can mediate particle selection. *Biol Bull*. 217:130-141.
- Pan, Y., A.D. Cembella, M.A. Quilliam. 1999. Cell cycle and toxin production in the benthic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Mar Biol*. 134:541-549
- Park, I., C. Han, S. Jin, B. Lee, H. Choi, J.T. Kwon, D. Kim, J. Kim, E. Lifirsu, W.J. Park, Z.Y. Park, D.H. Kim, C. Cho. 2011. Myosin regulatory light chains are required to maintain the stability of myosin II and cellular integrity. *Biochem J*. 434:171–180
- Pauley, G.B., B. Van Der Raay, D. Troutt. 1988. Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (Pacific Northwest). Pacific oyster. U.S. fish and Wildlife Service. Biological Report. 82(11.85):28.
- Pearce, I., J.H. Handler, G.M. Hallegraeff. 2005. Histopathology in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat caused by the dinoflagellate *Prorocentrum rhathymum*, *Harmful Algae*. 4:61-74.
- Perry, S.V. 1999. Troponin I: inhibitor or facilitator. *Mol Cell Biochem*. 190:9-32.

- Perry, S.V. 2003. What is the role of tropomyosin in the regulation of muscle contraction?. *J. Muscle Res Cell Motil.* 24:593-596.
- Phillips, D.J.H. 1976. The common mussel *Mytilus edulis* as an indicator of pollution by zinc, cadmium, lead and copper. I. Effects of environmental variables on uptake of metals. *Mar. Biol.* 38:56-69.
- Plumley, F.G. 1997. Marine algal toxins: biochemistry, genetics, and molecular biology. *Limn Oceanogr.* 42:1252-1264.
- Ponzone, A. M. Spada, S. Ferraris, I. Dianzani, L. Sanctis. 2004. Dihydropteridine Reductase Deficiency in Man: From Biology to Treatment. *Medicinal Res. Rev.* 24(2):127-150
- Prakash, S.R.S., C. Jayabaskaran. 2007. Cloning of two chickpea cDNAs encoding calcium-dependent protein. *Current Science.* 93:72-77
- Rabilloud, T. 1999. Solubilization of proteins in 2-D electrophoresis. An outline. *Methods Mol Biol.* 112:9-19.
- Rabilloud, T., M. Chevallet, S. Luche, C. Lelong. 2010. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *J. proteomics.* 73(11):2064-2077.
- Rausch de Traubenberg, C., M. Morlaix. 1995. Evidence of okadaic acid release into extracellular medium in cultures of *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge. En: Lassus, P., G. Arzul, E. Erard-Le-Denn, P. Gentien, C. Marcaillou-Le-Baut. (Eds.). *Harmful Marine Algal Blooms.* Paris: Lavoisier. 493-498 p.
- Rawlings, N.D., A.J. Barrett. 1994. Families of serine peptidases. *Methods Enzymol.* 244:19-61.
- Riobó, R., E. López, J.M. Franco. 2012. CHAPTER 8: Chemical methods for detecting phycotoxins: LC and LC/MS/MS. En: Cabado, G. A., J.M. Vieites. 2012. *New Trends in Marine and Freshwater Toxins: Food and Safety Concerns.* Advances in Food Safety and Food Microbiology. 403pp.
- Rios, H., S.V. Koushik, H. Wang, J. Wang, H.M. Zhou, A. Lindsley, R. Rogers, Z. Chen, M. Maeda, A. Kruzynska-Frejtag, J.Q. Feng, S.J. Conway. 2005. Periostin null mice

- exhibit dwarfism, incisor enamel defects, and an early-onset periodontal diseaselike phenotype. *Mol Cell Biol.* 25:11131-11144.
- Roberts, S., G. Goetz, S. White, F. Goetz. 2008. Analysis of Genes Isolated from Plated Hemocytes of the Pacific Oyster, *Crassostreas gigas*. *Mar Biotechnol.* 11:24-44
- Rodríguez-Jaramillo, C., M.A. Hurtado, E. Romero-Vivas, J.L. Ramírez, M. Manzano, E. Palacios. 2008. Gonadal development and histochemistry of the tropical oyster, *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) during an annual reproductive cycle. *J Shell Res.* 27:1129-1141.
- Rodríguez-Ortega, M.J., B.E. Grøsvik, A. Rodríguez-Ariza, A. Goksøyr, J. López-Barea. 2003. Changes in protein expression profiles in bivalve molluscs (*Chamaelea gallina*) exposed to four model environmental pollutants. *Proteomics.* 3:1535-1543.
- Rodríguez, P.M., T.S. Silva, J. Días, J. Jessen. 2012. Proteomics in aquaculture: applications and trends. *J. proteomics.* 75(14):4325-4345
- Romeis, T., A. A. Ludwig, R. Martin, J.D.G. Jones. 2001. Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *EMBO J.* 20:5556–5567
- Romero- Ruiz. A., M. Carrascal, J. Alhama, J.L. Gómez-Ariza, J. Abian, J. López-Barea, 2006. Utility of proteomics to assess pollutant response of clams from the Doñana bank of Guadalquivir Estuary (SW Spain). *Proteomics.* 6:245-255.
- Saavedra, C., E. Bachèreb. 2006. Bivalve genomics. *Aquaculture.* 256:1-14.
- Sahni, A., N. Wang, J. D. Alexis. 2010. UAP56 is an important regulator of protein synthesis and growth in cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 393:106-110.
- Sánchez, B.C., K. Ralston-Hooper, S.M. Sepúlveda. 2011. Review of recent proteomic applications in aquatic toxicology. *Environmental toxicology and chemistry.* 30:274–282.
- Sar, E.A., M.E. Ferrar, B. Reguera. 2002. Floraciones algales nocivas en el Cono Sur Americano. Instituto Español de Oceanografía. 311 pp.
- Schmid SR, Linder P. Translation initiation factor 4A from *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of residues conserved in the D-E-A-D family of RNA helicases. *Mol Cell Biol.* 11:3463-71.

- Schmidt, A., M.N. Hall. 1998. Signaling to the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev. Biol.* 14:305-338.
- Schreiber, M.C., C.J. Karlo, G.E. Kovalick. 1997. A novel cDNA from *Drosophila* encoding a protein with similarity to mammalian cysteine-rich secretory proteins, wasp venom antigen 5, and plant group pathogenesis related proteins. *Gene.* 191:135-141.
- Schroder, M. 2008. Endoplasmic reticulum stress responses. *Cell Mol Life Sci.* 65:862-894.
- Scotti, P.D., S.C. Dearing, D.R. Greenwood, 2007. Characterization of cavortin, the major haemolymph protein of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *NZ J. Mar. Freshwater Res.* 41:91-101.
- Sevilla, H.M., 1993. Las ostras de México. Aspectos básicos para su cultivo, *In: Vite-García M.N.* 2002. Crecimiento, mortalidad e índice de condición del ostión *Crassostrea gigas* (Thunberg 1975) en un cultivo piloto comercial en la Bahía Tangolunda, Oaxaca, México. Tesis de licenciatura, Universidad del Mar, Oaxaca, México.
- Sha, Z., H. Liu, Q. Wang, Y. Liu, Y. Lu, M. Li, S. Chen. 2012. Channel catfish (*Ictalurus punctatus*) protein disulphide isomerase, PDIA6: Molecular characterization and expression regulated by bacteria and virus inoculation. *Fish & Shellfish Immunology.* 33:220-228
- Shelton, M.D., P.B. Chock, J.J. Mieyal. 2005. Glutaredoxin: role in reversible protein S-glutathionylation and regulation of redox signal transduction and protein translocation. *Antioxid. Redox Signal.* 7:348-366.
- Shepard, J.L., B. Olsson B., M. Tedengren, B.P. Bradley, 2000. Protein expression signatures identified in *Mytilus edulis* exposed to PCBs, copper and salinity stress. *Mar Environ Res.* 50:337-340.
- Shepard, J.L., B.P. Bradley. 2000. Protein expression signatures and lysosomal stability in *Mytilus edulis* exposed to graded copper concentrations. *Mar Environ Res.* 50:457-463.
- Shrader, E.A., T.R. Henry, M.S. Greeley, B.P. Bradley. 2003. Proteomics in zebrafish exposed to endocrine disrupting chemicals. *Ecotoxicology.* 12:485-488.
- Sierra-Beltrán, A.P., R. Cortés-Altamirano, M.C. Cortés-Lara. 2005. Occurrences of *Prorocentrum minimum* (Pavillard) in México. *Harmful Algae.* 4:507-517.

- Small, K. S., M. Brudno, M.M. Hill, A. Sidow. 2007. Extreme genomic variation in a natural population. *Proc. Natl Acad Sci. USA* 104:5698–5703.
- Smith, D.M., L.A. Collins-Racie, V.A. Marigo, D.J. Roberts, N.M. Davis, C. Hartmann, R. Schweitzer, E.R. LaVallie, L. Gamer, J. McCoy, C.J. Tabin. 2001. Cloning and expression of a novel cysteine-rich secreted protein family member expressed in thyroid and pancreatic mesoderm within the chicken embryo. *Mech Dev.* 102(1-2):223-226.
- Solaro, R.J., P. Rosevear, T. Kobayashi. 2008. The unique functions of cardiac troponin I in the control of cardiac muscle contraction and relaxation. *Biochem Biophys Res Commun.* 369:82-87.
- Souchelnytskyi, S. 2005. Bridging proteomics and systems biology: What are the roads to be traveled?. *Proteomics.* 5:4123-37
- Steidinger, K., K. Tangen. 1997. Dinoflagellates. En: Thomas R.C. (Ed.) *Identifying marine diatoms and dinoflagellates.* Academic press, Inc., harcourt b. and company, San Diego, Ca. USA, 387-598p.
- Suárez-Castillo, E.C., W.E. Medina-Ortíz, J.L. Roig-López, J.E. García-Arrarás. 2004. Ependymin, a gene involved in regeneration and neuroplasticity in vertebrates, is overexpressed during regeneration in the echinoderm *Holothuria glaberrima*. *Gene.* 34:133-143.
- Suárez-Castillo, E.C., J.E. García-Arrarás. 2007. Molecular evolution of the ependymin protein family: a necessary update. *BMC Evol Biol.* 7:23-42.
- Svensson, A., L. Förlin. 1998. Intracellular effect of okadaic acid in the blue mussel *Mytilus edulis*, and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Mar Environ Res.* 46:449-452.
- Szent-Györgyi, A.G., V.N. Kalabokis, C.L. Perreault-Micale. 1999. Regulation by molluscan myosins. *Mol. Cell. Biochem.* 190:55-62.
- Taghon, G.L., 1982. Optimal foraging by deposit-feeding invertebrates: roles of particle size and organic coating. *Oceanología.* 52:295-304
- Takayama, I., A. Kudo. 2012. Periostin in dental science. *Japanese Dental Science Review.* 48:92-98.
- Takeda, K., S. Akira. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology.* 17:1-14.

- Takeshita, S., R. Kikuno, K. Tezuka, E. Amannt. 1993. Osteoblast-specific factor 2: cloning of a putative bone adhesion protein with homology with the insect protein fasciclin I. *Biochem J.* 294:271-278.
- Talakhun, W., S. Roytrakul, N. Phaonakrop, S. Kittisenachai, B. Khamnamtong, S. Klinbunga, P. Menasveta. 2012. Identification of reproduction-related proteins and characterization of the protein disulfide isomerase A6 cDNA in ovaries of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics.* 7(2):180-190.
- Taylor, F.J.R. 1987. *The Biology of Dinoflagellates*. Botanical Monographs, London, Blackwell. 21:1-23.
- Thompson, E.L., D.A. Taylor, S.V. Nair, G. Birch, P.A. Haynes, D.A. Raftos. 2011. A proteomic analysis of the effects of metal contamination on Sydney Rock Oyster (*Saccostrea glomerata*) haemolymph. *Aquatic Toxicology* 103:241-249.
- Thompson, E.L., D.A. Taylor, S.V. Nair, G. Birch, P.A. Haynes, D.A. Raftos. 2012. Proteomic discovery of biomarkers of metal contamination in Sydney Rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Aquatic Toxicology* 109:202-212
- Tindall, D., D. Miller, J. Bomber 1989. Cultures and toxicity of dinoflagellates from ciguatera endemic regions of the world. *Toxicon.* 27:83.
- Toivola, D.M., P. Strnad, A. Habtezion, M.B. Omary. 2010. Intermediate filaments take the heat as stress proteins. *Trends in Cell Biology.* 20:79:91
- Tomanek, L. 2011. Environmental proteomics: changes in the proteome of marine organisms in response to environmental stress, pollutants, infection, symbiosis, and development. *Annu Rev Mar Sci.* 3:373-99.
- Tomanek, L., M.J. Zuzow, A.V. Ivanina, E. Beniash, I.M. Sokolova. 2010. Proteomic response to elevated PCO<sub>2</sub> level in eastern oysters, *Crassostrea virginica*: evidence for oxidative stress. *J. Exp. Biol.* 214:1836-1844
- Tomanek, L., M.J. Zuzow. 2010. The proteomic response of the mussel congeners *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* to acute heat stress: implications for thermal tolerance limits and metabolic costs of thermal stress. *J Exp Biol.* 213:3559-74.

- Tuteja, R. 2011. Helicases involved in splicing from malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Int.* 60:335-340
- Umasuthan, N., D.A. Elvitigala, K.S. Revathy, Y. Lee, I. Whang M.A. Park, J. Lee. 2012. Identification and in silico analysis of a novel troponin C like gene from *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia: Veneridae) and its transcriptional response for calcium challenge. *Gene*. 37981(12):1-8
- Venier, P., C. De Pitt, A. Pallavicini, F. Marsano, L. Varotto, C. Romualdi, F. Dondero, A. Viarengo, G. Lanfranchi. 2006. Development of mussel mRNA profiling: can gene expression trends reveal coastal water pollution. *Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen*. 602:121-134
- Vicente-Manzanares, M., X. Ma, R.S. Adelstein, A.R. Horwitz. 2009. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10:778-90.
- Wan, B. Y. Lin, T. Mou. 2007. Expression of rice Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinases (CDPKs) genes under different environmental stresses. *FEBS Letters* 581:1179-1189.
- Ward, E.J., J.S. Levinton, T. Cicci. 1998. Particle sorting in bivalves: in vivo determination of the pallial organs of selection. *Mar Biol*. 131:283-292.
- Ward, E.J., J.S. Levinton, E.S. Shumway. 2003. Influence of diet on pre-ingestive particle processing in bivalves I: Transport velocities on the ctenidium. *J. of Exp. Mar Biol Ecol*. 293:129-149
- Ward, J. E., N. M. Targett. 1989. Influence of marine microalgal metabolites on the feeding behavior of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol*. 101:313-321.
- Ward, J.E. 1996. Biodynamics of suspension-feeding in adult bivalve molluscs: particle capture, processing and fate. *Invertebr. Biol*. 115:218-231.
- Wikfors, G., R. Smolowitz. 1993. Detrimental effects of *Prorocentrum* isolate upon hard clams and bay scallops in laboratory feeding studies. In: Smayda TJ, Shimizu Y (eds) *Toxic phytoplankton bloom in the sea*. Elsevier Science. 447-452.
- Wikfors, G., R. Smolowitz. 1995. Experimental and histological studies of four life history stages of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, exposed to a culture strain of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Biol Bull*. 188:313-328.

- Wolfgang, K., J. Vandekerckhove. 1992. Structure and function of actin. *Anna. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 21:49-76.
- Wright, C.P., J. Noirel, S-Y. Ow, A. Fazeli. 2012. Review of current proteomics technologies with a survey on their widespread use in reproductive biology investigations. *Theriogenology.* 77:738–765.
- Wu, M., A.K. Singh. 2011. Single-cell protein analysis. *Biotechnology.* 23:83-88.
- Xie, X., D.H. Harrison, I. Schlichting, R.M. Sweet, V.N. Kalabokis, A.G. Szent-Gyorgyi, C. Cohen. 1994. Structure of the regulatory domain of scallop myosin at 2.8 Å resolution. *Nature* 368:306-312.
- Yasumoto, T., N. Seino, Y. Murakami, M. Murata. 1987. Toxins produced by benthic dinoflagellates. *Biol. Bull.* 172:128-131.
- Yuasa, H.J., Takagi, T., 2000. The genomic structure of the scallop, *Patinopectin yessoensis* troponin C gene: a hypothesis for the evolution of troponin C. *Gene.* 245:275-281.
- Zapata, I., M. Wick. 2012. Electrophoresis-Based Proteomic Meat Animal Research. *Electrophoresis,* 50(3):261-269
- Zhang, G., X Fang, X. Guo, L. Li, R. Luo, F. Xu, P. Yang. et al. 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature,* 490(7418):49-54
- Zhang, Y., L.K. Colabroy, T.P. Begley, S.E. Ealick. 2005. Structural studies on 3-hydroxyanthranilate-3,4-dioxygenase: the catalytic mechanism of a complex oxidation involved in NAD biosynthesis. *Biochemistry.* 44(21):7632-7643.

## 11. Anexos

### ANEXO I

Base de datos obtenidos a partir del análisis de las imágenes 2D con la ayuda del programa Melanie 7.0® de los organismos expuestos a:

#### a) células completas

Match ID	Fold	Control	<i>P. lima</i>	<i>P. minimum</i>	<i>P. rhathymum</i>	Anova	ANOVA < 0.05
1	1.36258	1.13778	1.16585	1.12001	0.855617	0.621666	1
0	1.83431	1.44504	2.20506	2.63697	2.650640	0.582381	0
2	4.38179	0.338525	1.48334	0	0.981882	0.105491	0
3	1.50854	0.746388	0.801123	0.907779	1.12595	0.900612	0
4	1.04709	0.762117	0.760207	0.767329	0.754667	0.999496	0
5	4.12938	1.21161	3.96604	5.0032	2.73939	0.0462377	1
6	1.39719	1.81783	1.862	2.53984	2.00462	0.756922	0
7	1.49778	0.835321	0.855101	1.25112	0.844919	0.661641	0
8	2.11892	0.716447	1.26202	1.51809	1.34504	0.222337	1
9	1.51265	0.844987	0	0	1.27817	0.131718	0
10	1.86323	5.63949	8.36539	6.83587	10.5077	0.156674	0
11	3.7523	1.14891	0.808452	0.313895	1.17783	0.0908327	1
12	1.3397	3.47812	2.59619	2.94301	2.61456	0.897843	0
13	1.41932	1.11709	1.12964	0	1.58551	0.0457821	1
14	1.14914	1.43285	0	0	1.24689	1.52E-04	1
15	1.29618	4.72294	5.54123	5.07369	6.12177	0.941127	1
16	2.761	1.7326	4.3115	4.78371	4.04918	0.0942544	1
17	1.40729	1.55851	1.54687	1.37846	1.93989	0.59272	0
18	2.17111	0.853643	0	1.85335	0.986458	0.0792186	0
19	2.25758	1.56079	1.88106	3.5236	2.14846	0.321412	0
20	3.13898	0.747801	0.710727	1.85682	2.23096	0.246987	0
21	2.76809	0.95388	1.24557	2.64043	1.63804	0.034104	1
22	1.48993	1.16635	1.15753	1.72463	1.6395	0.324025	0
23	1.60392	2.15989	2.14607	2.36333	3.44212	0.501659	0
24	2.31735	1.5303	0	3.54624	0	0.0789584	0
25	4.19611	3.3539	5.32288	1.41274	5.92799	0.0832109	1
26	2.80401	0.677682	0	1.90023	0	0.0541504	0
27	2.73973	0.28408	0	0.778303	0	0.53494	0
28	1.25802	0.986119	1.09445	1.24056	0	0.112937	0

29	3.79905	1.93791	7.3622	7.05333	6.71507	0.220575	1
30	1.82225	1.65008	2.26356	2.23898	3.00687	0.154763	1
31	6.4298	2.1339	0.331877	0	0	0.020936	1
32	2.55441	1.07342	0.420221	0	0	0.0633704	0
33	1.58799	0.660941	0.416213	0	0	0.324814	0
34	2.92017	0.200492	0.585472	0	0	0.529932	0
35	1.63089	5.52903	9.01724	7.55509	6.82576	0.416041	1
36	2.79653	1.28414	2.12426	1.2737	0.759604	0.731479	1
37	1.6918	2.61721	2.43716	4.12319	3.37355	0.580571	1
38	1.77325	2.02694	3.59427	2.54679	2.79115	0.842742	1
39	2.35097	3.21268	5.23312	2.22594	2.80151	0.307784	1
40	0	0	0	0	1.28331	3.81E-05	1
41	0	0	0	0	1.40896	1.82E-04	1
42	0	0	0	0	0.562135	0.0592923	0
43	0	0	0	1.90646	0	0.0123566	1
44	0	0	1.42438	0	0	0.0017732	1
45	0	0	1.23796	0	0	1.82E-04	1
46	0	0	0.882388	0	0	2.24E-04	1
47	0	1.71848	0	0	0	0.0098759 1	1
48	0	1.44471	0	0	0	5.06E-04	1
49	0	1.49246	0	0	0	0.0058126 1	0
50	0	0.433965	0	0	0	0.0563145	0
51	0	1.33125	0	0	0	0.126433	0
52	0	0.660751	0	0	0	0.0607835	0
53	0	0.756859	0	0	0	0.0532638	0
54	0	0.810781	0	0	0	0.163548	0
55	0	0.27642	0	0	0	0.0518954	0
56	0	0.712441	0	0	0	0.0901244	0
57	0	0.350371	0	0	0	0.0623705	0
58	0	0.481439	0	0	0	0.060591	0
59	0	0.375059	0	0	0	0.0638952	0
60	0	0.820809	0	0	0	0.0635136	0
61	0	1.5266	0	0	0	0.142016	0
62	0	0.517194	0	0	0	0.0521015	0
63	0	1.22235	0	0	0	8.41E-04	0

**b) Extractos acuosos**

<b>Match ID</b>	<b>Fold</b>	<b>Control</b>	<b><i>P. lima</i></b>	<b><i>P. minimum</i></b>	<b><i>P. rhathymum</i></b>	<b>Anova</b>	<b>ANOVA &lt;0.05</b>
0	2.08552	0.73975	0.726458	0.35470	0.547804	0.866192	0
1	2.82771	1.22268	0.789329	2.23199	1.6429	0.210096	0
2	4.17187	0.30625	0.746183	1.27767	0.990205	0.601395	0
3	1.44359	2.00592	1.84701	2.66633	1.89199	0.873164	0
4	4.43281	0.79116	1.24671	0.33450	1.48278	0.109942	0
5	4.98945	0.51661	0.309116	1.54232	0.707833	0.341849	0
6	2.02344	0.79297	1.34993	0.66714	1.20506	0.285446	0
7	3.28698	0.34566	0.374338	1.13618	0.673065	0.374942	0
8	1.61596	0.81512	0.725745	0.57514	0.50442	0.935061	0
9	1.29498	5.26887	4.90792	5.33814	4.12218	0.894079	0
10	1.02267	0.74159	0.744783	0.74087	0.751438	0.999929	0
11	2.31362	1.65072	2.26412	3.02404	1.30706	0.449015	0
12	3.07783	0.37142	0	1.14317	0.718967	0.0534553	0
13	1.41005	0.62813	0.728079	0.62462	0.880757	0.974452	0
14	1.3146	4.04114	3.22641	3.07405	3.20397	0.939915	0
15	1.30286	0.89992	0.940547	0.93678	0.721908	0.786354	0
16	1.23934	0.22532	0	0	0.279251	0.59166	0
17	4.11787	0.40327	1.02624	1.66065	0.636599	0.376748	0
18	1.7036	0.76598	1.30494	0.81884	1.10028	0.154242	0
19	1.33984	7.49938	8.52288	6.36112	8.12583	0.749947	0
20	1.95885	1.40655	1.10145	1.46048	0.74558	0.612061	0
21	4.06746	1.71933	0	0	0.422703	0.0046780	1
22	2.95746	0.57030	0.825397	0.47600	1.40775	0.698437	0
23	5.05984	0.53588	0.35383	1.53603	0.303572	0.267431	0
24	1.84882	10.18130	5.50691	6.62498	9.74092	0.304009	0
25	4.0175	0.84436	0.374724	1.32577	1.50545	0.552226	0
26	1.97272	1.52988	2.1634	3.01802	1.7447	0.722851	0
27	1.41745	5.82266	6.33791	5.57628	4.47133	0.041513	1
28	4.52024	2.32327	2.42846	0	0.537241	0.098497	0
29	2.01988	2.16724	1.75311	1.18979	2.40322	0.51817	0
30	1.15279	5.44830	6.04776	5.24621	5.35101	0.963814	0
31	3.52363	1.73162	1.4035	0.49143	0.975327	0.660339	0
32	1.57069	5.78344	5.6273	4.03975	6.3452	0.678941	0
33	2.00517	1.82789	3.11617	1.55407	2.06329	0.442884	0
34	2.41976	2.83949	2.27313	1.17346	2.68643	0.114786	0
35	1.18102	2.92483	2.81407	2.77966	3.28283	0.910516	0

36	1.71536	1.32062	2.00739	1.72131	2.26533	0.749394	0
37	7.95535	0.51110	1.34377	2.23215	4.06605	0.14199	0
38	1.3931	1.71038	1.25968	0	1.22776	0.0369555	1
39	2.25989	2.11986	2.38798	1.19010	1.05668	0.276099	0
40	1.84844	0.96186	0.97331	0.76031	1.40539	0.504471	0
41	2.60671	1.33826	0.513388	0.64210	0.65598	0.0979232	0
42	1.75695	0.92058	1.22337	1.42876	1.61742	0.251857	0
43	1.5677	4.23913	2.70405	3.22795	3.18932	0.821177	0
44	2.46679	1.19378	0	0	0.483939	0.543432	0
45	3.38368	0.20432	0.292305	0.69135	0	0.164918	0
46	3.80607	0.17171	0.583851	0.15340	0	0.254763	0
47	1.16116	1.64604	1.91132	0	0	0.0356739	1
48	1.04105	0	0.664259	0.69153	0	0.409235	0
49	2.32458	0	0.324816	0.75505	0.743466	0.327862	0
50	2.01262	0	0.991675	1.99586	0	0.0031993	1
						4	
51	0	0	0	1.36619	0	0.13493	0
52	0	0	0	0.05629	0	0.441099	0
53	0	0	0	0.36634	0	0.148857	0
54	0	0	0	0.85206	0	0.0615038	0
55	0	0	0.313961	0	0	5.68E-05	1
56	0	0	0.518952	0	0	0.228762	0
57	0	1.54237	0	0	0	7.45E-06	1

### c) Extractos orgánicos

Match ID	Max	Fold	Control	<i>P. lima</i>	<i>P. minimum</i>	<i>P. rhathymum</i>	Anova	ANOVA < 0.05
0	4.56955	2.74996	1.66168	3.45171	4.56955	2.93783	0.166382	0
1	1.42878	2.37732	0.601003	0.882462	1.42878	0.690032	0.146104	0
2	1.08016	2.44639	1.08016	0.441534	0.488384	0.902151	0.119023	0
3	4.17388	1.75447	2.379	3.14989	4.17388	2.87655	0.121811	0
4	1.22663	6.67807	0.18368	0.382224	1.22663	0.43288	0.243876	0
5	1.18516	4.84343	0.244695	1.10763	0.96587	1.18516	0.636851	0
6	1.14246	2.12383	0.638189	0.537924	1.14246	0.554486	0.510402	0
7	1.03869	2.52584	1.03869	0.411223	0.921438	1.02702	0.424199	0
8	2.46864	1.90554	2.20607	1.65323	1.2955	2.46864	0.349936	0
9	0.374353	1.09796	0.374353	0	0	0.340954	0.0487479	1
10	0.915576	1.18106	0.755576	0.748335	0.755213	0.767609	0.860172	0

11	1.47694	1.99345	1.19643	0.767461	0.740896	1.47694	0.141273	0
12	0.420594	1.01508	0.414345	0	0	0.420594	0.151019	0
13	2.53293	1.55848	1.84948	1.7331	1.62525	2.53293	0.126566	0
14	0.88277	1.57696	0.88277	0.601134	0.559793	0.723381	0.0718353	0
15	0.681342	3.48788	0.195345	0.655651	0	0.681342	0.265645	0
16	0.972777	1.8228	0.972777	0.580672	0.533673	0.725369	0.711086	0
17	0.815574	1.30752	0.623777	0.682336	0.650338	0.816308	0.0488296	1
18	7.95126	4.62973	7.95126	3.55572	1.71743	4.37074	0.119157	0
19	1.25551	4.10401	0.305924	0	1.25551	0.699669	0.00985895	1
20	1.74879	1.43602	1.62377	1.74879	1.2178	1.70441	0.147741	0
21	1.1838	1.58596	0.978414	0.873307	0.746427	1.1838	0.521356	0
22	1.33666	3.25568	1.27954	1.29435	0.410564	1.33666	0.118213	0
23	0.625958	2.1253	0.423523	0.294526	0.50993	0.625958	0.710248	0
24	4.38028	4.8507	4.38028	0.903019	1.9754	2.57635	0.00755487	1
25	3.68404	1.14344	3.68404	3.22188	3.23693	3.44429	0.913281	0
26	0.899841	1.05541	0.899841	0	0	0.852598	0.207284	0
27	1.03028	2.2378	1.03028	0.462564	0.460401	0.980088	0.052472	0
28	2.2414	2.50309	1.7267	2.2414	0.895453	2.00479	0.291426	0
29	0.788742	1.39259	0.788742	0	0	0.566383	0.0143422	1
30	1.00415	2.55992	0.392259	0.756681	0.773854	1.00415	0.559479	0
31	5.52764	1.44148	3.8347	5.52764	4.73894	3.92421	0.077856	0
32	1.38855	2.1328	1.24807	1.38855	0.651046	1.33463	0.195465	0
33	7.07528	1.37927	5.12972	6.49323	7.07528	5.77369	0.198918	0
34	0.891319	5.59322	0.891319	0.2941	0.159357	0.559876	0.0173948	1
35	5.01357	2.66951	5.01357	1.97217	1.87809	3.40605	0.118861	0
36	1.19684	2.47948	1.19684	0.521737	0	0.482698	0.0582499	0
37	2.17788	3.6316	1.50113	2.17788	1.32586	0.599703	0.354554	0
38	2.50336	2.00395	1.61232	2.15198	2.50336	1.24921	0.5888	0
39	3.64442	1.38823	3.64442	2.89937	2.62522	3.6409	0.0324224	1
40	1.85729	3.03022	1.22199	0.612922	1.07874	1.85729	0.0192307	1
41	1.4742	1.60781	1.4742	1.45583	0.916903	1.44562	0.688541	0
42	3.79391	2.05695	2.72983	1.84443	2.12796	3.79391	0.237869	0
43	2.57617	2.34607	2.57617	1.09808	2.23867	1.13921	0.162885	0
44	1.4707	1.06374	1.38258	0	0	1.4707	0.219551	0
45	1.0024	1.57253	0.637442	1.0024	0.749673	0.988941	0.81896	0
46	1.62912	1.37917	1.18123	1.62912	1.38102	1.49894	0.975871	0
47	2.21932	7.3667	0.473731	0.301264	0	2.21932	0.132602	0
48	0.825954	1.44139	0.573027	0.769713	0.823561	0.825954	0.171985	0
49	2.533	5.85538	0.432594	1.06874	2.533	1.08054	0.0893859	0
50	1.39956	1.25566	1.1146	0	1.39956	0	0.0146151	1
51	0.793333	1.83706	0.793333	0	0.43185	0	0.242049	0

52	1.88354	1.23028	1.88354	0	1.53099	0	0.0381469	1
53	1.32975	1.59585	1.32975	0.833259	1.04362	1.10137	0.439869	0
54	1.06221	2.03423	0.921117	0.716596	0.522166	1.06221	0.69859	0
55	2.43583	2.4695	0.986362	2.43583	1.76521	1.44489	0.495173	0
56	0.759098	1.90962	0.673255	0.517102	0.759098	0.397513	0.845258	0
57	2.26415	1.06393	0	2.1281	2.26415	2.25427	0.334763	0
58	0.814102	1.31483	0	0.597818	0.576809	0.720806	0.319999	0
59	1.75065	1.47544	0	1.30399	1.75065	1.18653	0.371418	0
60	0.729934	1.21694	0	0.599809	0.729934	0.715784	0.335272	0
61	0.758453	1.87332	0.592979	0.758453	0.525485	0.404871	0.676029	0
62	1.59493	2.52336	0	0.632066	1.59493	0	0.0558855	0
63	0.224374	2.14414	0	0.104645	0	0.224374	0.204638	0
64	0.534734	0	0	0	0	0.534734	0.0783484	0
65	0.658613	0	0	0	0	0.658613	0.200782	0
66	0.451636	0	0	0	0	0.451636	0.0562951	0
67	0.407408	0	0	0	0	0.407408	0.0539149	0
68	0.520042	0	0	0	0	0.520042	0.0519593	0
69	0.369291	0	0	0	0	0.369291	0.0585338	0
70	0.815491	0	0	0	0.815491	0	5.14E-04	1
71	1.43464	0	0	1.43464	0	0	0.155499	0
72	0.30088	0	0	0.30088	0	0	0.062644	0
73	0.552864	0	0	0.552864	0	0	0.0855548	0
74	0.455512	0	0	0.455512	0	0	0.161853	0
75	0.495461	0	0	0.495461	0	0	0.25395	0
76	0.496848	0	0	0.496848	0	0	0.294032	0
77	4.20699	0	4.20699	0	0	0	7.37E-05	1
78	0.644119	0	0.644119	0	0	0	0.083917	0
79	0.473174	0	0.473174	0	0	0	0.0561618	0
80	0.397267	0	0.397267	0	0	0	0.0702859	0
81	0.754321	0	0.754321	0	0	0	0.051991	0