



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

ANÁLISIS FISIOLÓGICO Y TRANSCRIPTÓMICO DE  
LA RESPUESTA INMUNE DE JUVENILES DE LA  
ALMEJA CATARINA (*Argopecten ventricosus*, Sowerby  
II, 1842) A COMPUESTOS BIOACTIVOS ALTAMENTE  
DILUIDOS.

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

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

P r e s e n t a

**Jesús Antonio López Carvallo**

La Paz, Baja California Sur, Noviembre de 2020.

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 14 del Mes de Octubre del 2020, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"Análisis fisiológico y transcriptómico de la respuesta inmune de juveniles de la almeja Catarina (*Argopecten ventricosus*, Sowerby II, 1842) a compuestos bioactivos altamente diluidos"**

Presentada por el alumno:

**Jesús Antonio López Carvalho**

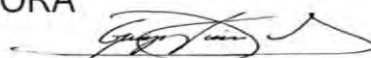
Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN Acuicultura

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



Dr. José Manuel Mazón Suástegui  
Co-Director de Tesis



Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega  
Co-Directora de Tesis



Dr. Dariel Tovar Ramírez  
Co-Tutor



Dr. Miguel Ángel Hernández Oñate  
Co-Tutor



Dr. Fernando Abasolo Pacheco  
Co-Tutor



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro  
Directora de Estudios de Posgrado y  
Formación de Recursos Humanos

## **Conformación de Comités**

### **Comité Tutorial**

Dr. José Manuel Mazón Suástegui  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.  
Co-Director de Tesis

Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.  
Co-Directora de Tesis

Dr. Dariel Tovar Ramírez  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.  
Co-Tutor

Dr. Miguel Ángel Hernández Oñate  
Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C.  
Co-Tutor

Dr. Fernando Abasolo Pacheco  
Universidad Técnica Estatal de Quevedo  
Co-Tutor

### **Comité Revisor de Tesis**

Dr. José Manuel Mazón Suástegui  
Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega  
Dr. Dariel Tovar Ramírez  
Dr. Miguel Ángel Hernández Oñate  
Dr. Fernando Abasolo Pacheco

### **Jurado de Examen**

Dr. José Manuel Mazón Suástegui  
Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega  
Dr. Dariel Tovar Ramírez  
Dr. Miguel Ángel Hernández Oñate  
Dr. Fernando Abasolo Pacheco

### **Suplentes**

Dr. Pedro Enrique Saucedo Lastra  
Dr. Ricardo Vázquez Juárez

## Resumen

El uso y abuso de antibióticos para evitar eventos de mortalidad en la acuicultura ha favorecido el desarrollo de cepas resistentes a estos compuestos, generando una problemática a nivel mundial. Para reducir la aplicación de antibióticos se ha propuesto el uso de compuestos bioactivos altamente diluidos (CBAD), algunos con reconocimiento oficial de la Secretaría de Salud como medicamentos homeopáticos de uso humano. Los CBAD se caracterizan por estimular los sistemas de defensa en organismos y su aplicación profiláctica incrementa la supervivencia en individuos que han sido retados ante patógenos. Debido a que existe poca información disponible sobre la interacción CBAD-organismos marinos, en este trabajo se evaluó su efecto profiláctico en juveniles de almeja Catarina *Argopecten ventricosus*, considerando como indicadores de respuesta, parámetros fisiológicos asociados a su condición general y un análisis transcriptómico utilizando tecnología RNA-Seq, con un enfoque dirigido a respuesta inmune. Se aplicó un diseño experimental por triplicado de cinco tratamientos: T1 (*Vibrio parahaemolyticus* 1D + *Vibrio alginolyticus* 1D), T2 (*Vibrio parahaemolyticus* 7C + *Vibrio alginolyticus* 7C), T3 (Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D), T4 (*Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C) y T5 (VidatoX<sup>®</sup> 31C), y tres controles: C1 (Etanol 87°G dinamizado 1C), C2 (Etanol 87°G diluido 1:100) y C3 (Agua destilada). Los juveniles se mantuvieron en condiciones controladas de laboratorio y el tratamiento correspondiente de aplico diariamente (100 µL L<sup>-1</sup>). Los resultados obtenidos sugieren que los mayores cambios en la respuesta fisiológica e inmune son atribuibles a los tratamientos T1 y T2, ya que generaron un incremento en el conteo de hemocitos en glándula digestiva (análisis histológico), e incrementos en la actividad catalasa en manto y superóxido dismutasa en branquia. Los organismos tratados con T3 y T5 mostraron una respuesta inmunomodulatoria pero en menor grado. El tratamiento T4 contribuyó a incrementar las reservas energéticas en manto, musculo y glándula digestiva. En el análisis del perfil transcriptómico, se registraron 4,043 transcritos expresados diferencialmente en branquia y 9,789 en manto. El análisis funcional mostró que los genes que responden a los CBAD están relacionados con la respuesta al reconocimiento de lo no-propio, endocitosis y respuesta inmune, entre otros. Estos resultados indican que los CBAD's permiten mantener o mejorar la condición fisiológica general de los organismos y activar una respuesta inmunomodulatoria en juveniles de *A. ventricosus*.

**Palabras clave:** Transcriptoma, Bivalvos, Sílice, Bacterias Patógenas.

Numero ORCID-0000-0002-74058665



Dr. José Manuel Mazón Suástegui

Vo. Bo. Co-Directores de Tesis



Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega

## Summary

The overuse of antibiotics to avoid high mortality in aquaculture production promotes the emergence of antibiotic resistance pathogenic bacteria strains, generating a worldwide concern. In order to reduce the use of these chemotherapies, the application of high diluted bioactive compounds (HDBC) have been proposed, some of them are recognized by the health secretary of México as homeopathic drugs for human consumption. The HDBC are known to stimulate the defense system of marine organisms and its prophylactic use increases survival of organisms challenged against pathogens. As little is known about the interaction organism-HDIC, we evaluate their prophylactic effect in *Argopecten ventricosus* juveniles, considering the general physiology condition and a comparative transcriptome analysis using RNA-Seq technology with a focus on the immune response. The experimental design included three replicates of five treatments: T1 (*Vibrio parahaemolyticus* 1D + *Vibrio alginolyticus* 1D), T2 (*Vibrio parahaemolyticus* 7C + *Vibrio alginolyticus* 7C), T3 (Sodium metasilicate 1D + Phosphoric acid 1D), T4 (*Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C) and T5 (VidatoX<sup>®</sup> 31C), and three controls: C1 (Ethanol 87°G 1C), C2 (Ethanol 87°G 1:100) y C3 (Distillated water). Juveniles were kept in laboratory controlled conditions and the respective treatment was daily added in each unit (100  $\mu\text{L L}^{-1}$ ). Results suggest that maximum immunomodulatory was attributed to treatments T1 and T2 which registered the highest increase in haemocyte count, catalase activity in mantle and superoxide dismutase activity in gill. Treatments T3 and T5 also registered an immunomodulatory response but in lower grade. Treatment T4 increased energetic reserves in mantle, muscle and digestive gland. The transcriptome profile analysis showed 4,043 differentially expressed genes in gill and 9,789 in mantle. The functional analyses showed that genes responding to HDBC were related to the non-self-recognition system, endocytosis and immune response. These results demonstrate that some HDBC allow maintaining or improving the general condition index and activate an immunomodulatory response in *A. ventricosus* juveniles.

**Keywords:** Transcriptome, Bivalves, Silica, Pathogenic Bacteria.



Dr. José Manuel Mazón Suástegui

Vo. Bo. Co-Directores de Tesis



Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega

## Dedicatoria

A todas aquellas personas que hacen de este viaje una experiencia inolvidable y especialmente para la nueva integrante de la familia, *Alessa*.

Esto va dedicado:

- a mis padres *Antonio & Gisela* por su apoyo en el ámbito familiar, académico y profesional, ellos fueron quienes me llevaron por primera vez a un laboratorio de investigación y quienes compartieron conmigo su amor por la investigación y el mar.
- a mi bella esposa *Caroli*, compañera de vida, por todo su apoyo y motivación que me da.
- y en especial para *Alessa*, quien llenó de alegría esta familia.

Me permito ampliar esta dedicatoria a mi hermana, abuelos, primos y tíos, quienes son una familia llena de una alegría contagiosa, la cual me permite visualizar el camino de la vida de una manera positiva y llena de oportunidades.

Dejo esta frase plasmada en este texto, para que el lector que se adentre a esta sección, recuerde que los nervios de un seminario, presentación, entrevista, congreso, proyecto o evaluación, son imperceptibles cuando uno recuerda que esta en el camino de la investigación por las ganas de aprender, por la curiosidad, por el deseo del conocimiento y su divulgación.

“Yo no canto para gustar, yo canto lo que me gusta”

Facundo Cabral

Gracias *Dharma*, mi compañera de escritorio, quien me hizo compañía durante las tardes, noches y madrugadas de escritura y lectura.

## **Agradecimientos**

Gracias a todos los que contribuyeron en el desarrollo de esta tesis doctoral y en mi formación académica. Tuve la fortuna de colaborar con una gran cantidad de personas y trabajar en múltiples laboratorios, lo que se tradujo en un mejor trabajo y una mejor tesis doctoral. No cabe duda que la multidisciplinariedad y el trabajo de equipo permite abordar un mismo problema con diversas perspectivas o puntos de vista, lo que enriquece este trabajo de investigación.

Gracias a todos por su apoyo para incrementar las redes de colaboración.

Agradezco a CONACyT por su apoyo (BECA CONACYT-301921) para continuar con mi formación académica.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (Unidad La Paz, BCS) y al Centro de investigación de Alimento y Desarrollo (Unidad Hermosillo, Son) por permitirme usar sus instalaciones, equipos y recursos materiales y humanos, para el desarrollo pleno de la presente investigación doctoral.

A mis Co-Directores de Tesis el Dr. José Manuel Mazón Suástegui y la Dra. Guadalupe Fabiola Arcos, quienes no solo me apoyaron en aspectos académicos, sino que también me apoyaron con el financiamiento requerido para mi asistencia a congresos, estancias de investigación y cursos de capacitación.

A mis Co-Tutores el Dr. Dariel Tovar Ramírez, Dr. Fernando Abasolo Pacheco y Dr. Miguel Ángel Hernández Oñate, siempre en la mejor disposición de apoyarme y dispuestos a resolver cualquier duda.

Gracias Dr. Miguel Ángel Hernández Oñate, por sus consejos encaminados a la mejora de esta investigación, y por la facilitarme la estancia de investigación en su institución (CIAD).

Al Dr. José Ángel Huerta Ocampo por sus visitas al cubículo y cuestionamientos siempre dirigidos al fortalecimiento de este trabajo.

A la M.C. María Gisela Carvallo Ruiz, M.C. Tania Carvallo Ruiz, M.C. Jesús Antonio Orozco Avitia, M.C. Ángel Javier Ojeda Contreras y M.C. Alfonso Sánchez Villegas por todo su apoyo y disponibilidad durante mi estancia en el CIAD.

Al Dr. José Antonio López Elías por su apoyo en la formación académica.

Al M.C. Miguel Robles Mungaray (Acuacultura Robles S.P.R. de R.I.) y Noroeste Sustentable (NOS) por aportar los organismos requeridos para esta investigación doctoral.

Al M.C. José Delfino Barajas Frías y Lic. Pablo Ormart Castro por su apoyo en la producción y mantenimiento de microalgas, y manejo zootécnico de los organismos en

el Laboratorio de Homeopatía Acuícola y Semillas Marinas del Programa de Acuicultura del CIBNOR.

A la Dra. Carmen Rodríguez Jaramillo y a María Eulalia Meza del Laboratorio de Histología e Histoquímica, quienes me ayudaron, capacitaron y entrenaron en el procesamiento, manejo e interpretación de las muestras, siempre dispuestas a ayudar y con una sonrisa en su rostro.

Al M.C. Roberto Hernández Herrera del Laboratorio de Bioquímica, quien siempre me apoyo en las diversas actividades del laboratorio y estuvo dispuesto a ayudar en cualquier duda.

A María Dolores Rondero Astroga y Sindi Areli Juan Antunes del Laboratorio de Bromatología, quienes estuvieron dispuestas a apoyar esta investigación, facilitándonos asesoría, instalaciones y equipos.

Al Ing. Julián Garzón Favela y Bióloga Adriana Greene Yee del Laboratorio de Microalgas, quienes siempre proporcionaron alimento para llevar a cabo el experimental, sin importar el día de la semana.

Al Lic. Horacio Sandoval Gómez, Tania Verónica Núñez Valdez, Lic. Osvelia Ibarra Morales, Lic. Leticia González Rubio Rivera, Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro, M.C. Edgar Armenta Espinosa, Lic. José Manuel Melero Astroga y Susana Luna García integrantes de Posgrado quienes se encuentran siempre dispuestos a ayudar a los alumnos que pasamos por esta institución.

A la Dra. Rosa María Morelos Castro y Dr. Jesús Martín Ramírez Orozco del Laboratorio de Inmunogenómica Marina por su apoyo en el asesoramiento en el procesamiento de muestras y estandarización del análisis por RT-qPCR.

A la M.C. Patricia Hinojosa Baltazar del Laboratorio de Fisiología Comparada por todo su apoyo brindado durante mi estancia en el laboratorio.

A la Dra. Norma Angélica Ochoa Álvarez del Laboratorio de Diagnostico Microbiológico. A la Dra. Martha Candelaria Reyes Becerril del Laboratorio de Inmunología y Vacunología. A la M.C. Susana Ávila Álvarez del Laboratorio de Genética Acuícola. A la Lic. Gabriela Mendoza Carrion, Dr. Ricardo Vázquez Juárez y Dra. Cristina Escobedo Fregoso del Laboratorio de Genómica y Bioinformática y a la M.C. Delia Irene Rojas Posada del Laboratorio de Genética Molecular.

Al comité asignado para el examen predoctoral (Dr. Fernando Abasolo Pacheco, Dr. Dariel Tovar Ramírez, Dra. Alejandra Nieto Garibay, Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz, Dr. Carlos Eliud Angulo Valdez) por sus aportaciones al trabajo, comentarios constructivos y por abrirme las puertas de sus laboratorios.



Me permito ampliar el agradecimiento a todos aquellos estudiantes de posgrado y Doctores que asisten constantemente al seminario de la academia de acuicultura con el fin de ayudar a mejorar diseños experimentales, contenido de información o estructuración de proyecto de tesis.

Espero no olvidar a nadie, ya que fueron muchas las personas que contribuyeron a enriquecer este trabajo doctoral.

No me queda más que agradecer a todos los amigos y compañeros que contribuyeron a generar preguntas para tratar de contestar interrogantes del trabajo. No existe duda de que el responder las preguntas formuladas sobre esta tesis doctoral, ha generado una mayor cantidad de dudas que por ahora quedarán pendientes de contestar, pero que en un futuro serán resueltas en una nueva rama de investigación básica, con aplicabilidad en producción acuícola.

## Contenido

<b>Resumen</b> .....	i
<b>Summary</b> .....	ii
<b>Dedicatoria</b> .....	iii
<b>Agradecimientos</b> .....	iv
<b>Contenido</b> .....	vii
<b>Lista de figuras</b> .....	ix
<b>Lista de tablas</b> .....	xiv
<b>Abreviaturas</b> .....	xv
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	5
2.1 Especie Modelo .....	5
2.2 Mecanismos de defensa en moluscos bivalvos: sistema inmune .....	7
2.3 Inmunomoduladores: CBADs como alternativa para fortalecer el sistema inmune en moluscos bivalvos .....	13
2.4 Transcriptómica: una herramienta para entender la acción de los CBADs en la almeja <i>Catarina A. ventricosus</i> .....	24
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	26
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	27
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	28
5.1 Objetivo general.....	28
5.2 Objetivos Particulares .....	28
<b>6. MATERIALES Y METODOS</b> .....	29
6.1 Obtención y aclimatación de los organismos.....	29
6.2 Cultivo de microalgas.....	30
6.3 Preparación de los compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs).....	30
6.4 Diseño experimental .....	32
6.5 Conteo de hemocitos .....	34
6.6 Actividad Antioxidante.....	34
6.7 Histología.....	35
6.8 Reservas energéticas .....	36
6.8.1 Carbohidratos totales.....	36
6.8.2 Proteínas totales.....	37
6.8.3 Lípidos totales.....	37
6.9 Crecimiento y supervivencia .....	38
6.10 Extracción de RNA y síntesis de cDNA .....	38
6.11 Análisis transcriptómico (RNA-Seq).....	41
6.11.1 Secuenciación Illumina .....	41
6.11.2 Ensamble de novo y anotación del transcriptoma .....	41
6.11.3 Expresión diferencial y análisis de enriquecimiento.....	43
6.11.4 Identificación de genes relacionados con la respuesta inmune .....	46

6.11.5 Validación de genes blanco por RT-qPCR .....	46
6.12 Análisis estadístico .....	50
<b>7. RESULTADOS</b> .....	<b>51</b>
7.1 Conteo de hemocitos .....	51
7.2 Bioquímica enzimática .....	52
7.2.1 Superóxido dismutasa (SOD) .....	52
7.2.2 Catalasa (CAT) .....	53
7.3 Análisis histológico .....	54
7.3.1 Índice muscular y digestivo .....	54
7.4 Análisis bioquímicos .....	56
7.4.1 Carbohidratos totales.....	56
7.4.2 Proteínas totales.....	56
7.4.3 Lípidos totales.....	57
7.5 Supervivencia y crecimiento .....	58
7.6 Análisis Transcriptómico .....	59
7.6.1 Ensamblaje del transcriptoma y anotación funcional .....	59
7.6.2 Análisis de expresión diferencial de transcritos .....	63
7.6.3 Enriquecimiento de expresión diferencial de genes regulados por efecto de compuestos bioactivos altamente diluidos .....	67
7.6.4 Agrupamiento y enriquecimiento funcional de los transcritos expresados diferencialmente por efecto de compuestos bioactivos altamente diluidos .....	71
7.6.5 Transcritos expresados diferencialmente asociados a la respuesta inmune. ....	76
7.7 Validación por RT-qPCR.....	78
7.7.1 Validación de los datos obtenidos por RNA-Seq mediante análisis de RT-qPCR .....	78
7.7.2 Validación de rutas metabólicas y procesos biológicos regulados por efecto de compuestos bioactivos altamente diluidos utilizando RT-qPCR.....	80
7.7.2.1. Genes asociados al sistema de reconocimiento de lo no-propio evaluados por RT-qPCR .....	82
7.7.2.2 Genes relacionados al proceso de internalización evaluados por RT-qPCR	83
7.7.2.3 Genes relacionados a la respuesta inmune evaluados por RT-qPCR....	85
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	<b>89</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	<b>104</b>
<b>10. LITERATURA CITADA</b> .....	<b>106</b>
<b>11. ANEXOS</b> .....	<b>127</b>

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Producción acumulada (toneladas) de almeja Catarina ( <i>Argopecten ventricosus</i> ) entre los años 2006 y 2014 (Base de datos extraídos de <a href="http://www.conapesca.gob.mx">http://www.conapesca.gob.mx</a> , Octubre 2020).....	5
<b>Figura 2.</b> Rutas de señalización relacionadas con la activación de la respuesta inmune en moluscos bivalvos (Imagen tomada de Gómez-Chiarri et al., 2015b). AMP: péptidos antimicrobianos; AP-1: proteína activadora 1; AVNV: necrosis viral aguda; bax: regulador de apoptosis; bcl-2: regulador de apoptosis Bcl-2; bid: agonista del dominio de muerte BH3; C1qdc: dominio reclutador de C1q; CARD: domino activador y reclutador de caspasas; CAS9: caspasa 9; CAT: catalasa; FADD: proteína fas asociado al dominio de muerte; Freps: proteína relacionada a fibrinógenos; GPX: glutatión peroxidasa ; IAP: proteína inhibidora de apoptosis; IKK: IκB quinasa; JNK: C-Jun N-terminal quinasa; LGBP: proteína con unión a LPS y -1,3 glucano; MEKK1: proteína activada por MAP; MKK: MAPK quinasa; Myd88: modulador de respuesta proinflamatoria mieloide 88; NF-κB: factor nuclear kappa B; PGRP: proteína reconocedora de peptidoglicanos; Propo: pro-fenoloxidasa; ROS: especies reactivas de oxígeno; SOD: superóxido dismutasa; Srs: receptores basura ricos en cisteína; TAK1: factor de crecimiento transformante activado por B quinasa. ....	10
<b>Figura 3.</b> Modelos de reconocimiento de los medicamentos homeopáticos en los sistemas biológicos (Imagen tomada de Bellavite et al., 2014b) según la dilución del compuesto bioactivo. ....	18
<b>Figura 4.</b> Unidades experimentales de surgencia utilizadas para evaluar el efecto de compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) en juveniles de almeja Catarina <i>Argopecten ventricosus</i> .....	30
<b>Figura 5.</b> Proceso aplicado para formular los tratamientos experimentales basados en compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs). Se explica el proceso de dinamización centesimal (dilución serial 1:100 y sucesión) que implica diluciones centesimales sucesivas. 1C: dilución $1 \times 10^{-2}$ ; 2C: dilución $1 \times 10^{-4}$ ; 3C: dilución $1 \times 10^{-6}$ ; 4C: dilución $1 \times 10^{-8}$ y 5C: dilución $1 \times 10^{-10}$ .....	31
<b>Figura 6.</b> Altura de la concha en juveniles de almeja Catarina <i>Argopecten ventricosus</i> .....	38
<b>Figura 7.</b> A) Diagrama del muestreo y logística que muestra la estrategia para realizar replicas biológicas de juveniles de almeja Catarina <i>Argopecten ventricosus</i> tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs), para llevar a cabo el análisis del perfil transcriptómico utilizando tecnología RNA-Seq y el análisis de expresión relativa por RT-qPCR. Cada diagrama muestra la agrupación que se realizó para cada tejido (manto y branquia) por condición experimental; B) Estrategia para evaluar expresión diferencial de genes en el análisis transcriptómico utilizando tecnología RNA-Seq. En ambos tejidos (manto y branquia) cada tratamiento fue comparado contra el control C1. T1: <i>V. parahaemolyticus</i> 1D + <i>V. alginolyticus</i> 1D, T2: <i>V. parahaemolyticus</i> 7C + <i>V. alginolyticus</i> 7C, T3: Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D, T4: <i>Silicea terra</i> <sup>®</sup> 7C + <i>Phosphoricum acidum</i> <sup>®</sup> 7C, T5: VidatoX <sup>®</sup> 31C, C1: Etanol 1C. ....	39
<b>Figura 8.</b> Diagrama de flujo que muestra la estrategia utilizada para realizar el análisis bioinformático del transcriptoma de juveniles de almeja Catarina <i>Argopecten ventricosus</i> , tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs). EDG: genes expresados diferencialmente. ....	45
<b>Figura 9.</b> Alineamiento de los unigenes AV166387, AV219751 y AV269449 obtenidos del ensamble transcriptómico de novo con hit al gen catalasa. ....	47

- Figura 10.** A) Conteo de hemocitos en juveniles de almeja Catarina *Argopecten ventricosus* tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) durante 21 días. Barras muestran promedio con sus respectivos intervalos de confianza al 95%. B) Microfotografías a 20X de glándula digestiva de juveniles de almeja *A. ventricosus* tratados con CBADs. D: glándula digestiva, L: lumen de los acinos, H: hemocitos. To: Inicio del experimento, T1: *V. parahaemolyticus* 1D + *V. alginolyticus* 1D, T2: *V. parahaemolyticus* 7C + *V. alginolyticus* 7C, T3: Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D, T4: *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C, T5: VidatoX<sup>®</sup> 31C, C1: Etanol 1C, C2: Etanol 1:100, C3: Agua destilada. Las letras muestran diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA P<0.05). ..... 51
- Figura 11.** Actividad superóxido dismutasa (SOD) en manto (A), branquia (B), glándula digestiva (C) y músculo (D) de juveniles de almeja Catarina *Argopecten ventricosus* tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBSDs), durante 21 días. Barras muestran promedio con sus respectivos intervalos de confianza al 95%. To: Inicio del experimento, T1: *V. parahaemolyticus* 1D + *V. alginolyticus* 1D, T2: *V. parahaemolyticus* 7C + *V. alginolyticus* 7C, T3: Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D, T4: *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C, T5: VidatoX<sup>®</sup> 31C, C1: Etanol 1C, C2: Etanol 1:100, C3: Agua destilada. Las letras muestran diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA P<0.05). ..... 52
- Figura 12.** Actividad catalasa (CAT) en manto (A), branquia (B), glándula digestiva (C) y músculo (D), de juveniles de almeja Catarina *Argopecten ventricosus* tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) durante 21 días. Barras muestran promedio con sus respectivos intervalos de confianza al 95%. To: Inicio del experimento, T1: *V. parahaemolyticus* 1D + *V. alginolyticus* 1D, T2: *V. parahaemolyticus* 7C + *V. alginolyticus* 7C, T3: Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D, T4: *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C, T5: VidatoX<sup>®</sup> 31C, C1: Etanol 1C, C2: Etanol 1:100, C3: Agua destilada. Las letras muestran diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA P<0.05). ..... 54
- Figura 13.** Índices histológicos IGD (A), IML (B) y IME (C) en juveniles de almeja Catarina *Argopecten ventricosus* tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) durante 21 días. Barras muestran promedio con sus respectivos intervalos de confianza al 95%. To: Inicio del experimento, T1: *V. parahaemolyticus* 1D + *V. alginolyticus* 1D, T2: *V. parahaemolyticus* 7C + *V. alginolyticus* 7C, T3: Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D, T4: *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C, T5: VidatoX<sup>®</sup> 31C, C1: Etanol 1C, C2: Etanol 1:100, C3: Agua destilada. Las letras muestran diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA P<0.05). ..... 55
- Figura 14.** Tasa de crecimiento (A) y supervivencia (B) de juveniles de almeja Catarina *Argopecten ventricosus* tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) durante 21 días. Barras muestran promedio con sus respectivos intervalos de confianza al 95%. To: Inicio del experimento, T1: *V. parahaemolyticus* 1D + *V. alginolyticus* 1D, T2: *V. parahaemolyticus* 7C + *V. alginolyticus* 7C, T3: Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D, T4: *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C, T5: VidatoX<sup>®</sup> 31C, C1: Etanol 1C, C2: Etanol 1:100, C3: Agua destilada. Las letras muestran diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA P<0.05). ..... 59
- Figura 15.** A) Resumen de la estadística de ensamble y anotación del transcriptoma de juveniles de almeja Catarina *Argopecten ventricosus* tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) durante 21 días. B) Distribución de transcritos presentes en el transcriptoma en relación a su tamaño. C) Especies con las que se tuvo un mayor número de hits. D) Resultados de BUSCO. C: transcritos completos; CS: transcritos completos con una

sola copia; CD: transcritos completos con duplicado; F: transcritos fragmentados; M: transcritos faltantes ..... 61

**Figura 16.** Principales 25 términos de gene ontology y rutas metabólicas anotadas en el transcriptoma de juveniles de almeja Catarina *Argopecten ventricosus* tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) durante 21 días. A) Histogramas que muestran los principales 25 procesos biológicos (barras azules), funciones moleculares (barras amarillas) y componentes celulares (barras moradas) y B) rutas metabólicas (barras naranja)..... 62

**Figura 17.** Porcentaje de lecturas alineadas y mapeadas con el transcriptoma de juveniles de almeja Catarina *Argopecten ventricosus* tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) durante 21 días. .... 64

**Figura 18.** Gráfica tipo heatmap en la que se contrastan todas las librerías según su coeficiente de correlación de Pearson. Las librerías son agrupadas entre ellas considerando el mayor coeficiente correlación. P: coeficiente de la correlación de Pearson. Color morado indica mayor correlación, color rosado pálido indica menor correlación. En la gráfica se muestran todas las réplicas experimentales (muestras biológicas por duplicado). Replica 1: “.1”; Replica 2: “.2” .....64

**Figura 19.** Diagramas de Venn utilizando transcritos sobre- y sub-regulados entre tratamientos y control C1 en tejido de (A) manto y (C) branquia de juveniles de almeja Catarina *Argopecten ventricosus* tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) durante 21 días. Los dendrogramas muestran la agrupación entre tratamientos comparando los transcritos expresados diferencialmente en (B) manto y (D) branquia. T1: *V. parahaemolyticus* 1D + *V. alginolyticus* 1D, T2: *V. parahaemolyticus* 7C + *V. alginolyticus* 7C, T3: Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D, T4: *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C, T5: VidatoX<sup>®</sup> 31C, C1: Etanol 1C. .... 66

**Figura 20.** Enriquecimiento de procesos biológicos de las categorías de Gene Ontology (GO) basado en la expresión diferencial de genes regulados en manto y branquia de juveniles de almeja Catarina *Argopecten ventricosus* tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) durante 21 días. Color café muestra el porcentaje de genes inducidos y color naranja muestra el porcentaje de genes reprimidos que participan en el proceso biológico. La cantidad de asteriscos muestra el nivel de significancia. T1: *V. parahaemolyticus* 1D + *V. alginolyticus* 1D, T2: *V. parahaemolyticus* 7C + *V. alginolyticus* 7C, T3: Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D, T4: *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C, T5: VidatoX<sup>®</sup> 31C, C1: Etanol 1C. .... 68

**Figura 21.** Enriquecimiento de rutas metabólicas (KO) basado en la expresión diferencial de genes regulados en manto y branquia de juveniles de almeja Catarina *Argopecten ventricosus* tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) durante 21 días. Color café muestra el porcentaje de genes inducidos y color naranja muestra el porcentaje de genes reprimidos que participan en el proceso biológico. La cantidad de asteriscos muestra el nivel de significancia. T1: *V. parahaemolyticus* 1D + *V. alginolyticus* 1D, T2: *V. parahaemolyticus* 7C + *V. alginolyticus* 7C, T3: Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D, T4: *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C, T5: VidatoX<sup>®</sup> 31C, C1: Etanol 1C..... 70

**Figura 22.** Gráfica heatmap que muestra la agrupación jerárquica de la expresión diferencial de los transcritos en manto de juveniles de almeja Catarina *Argopecten ventricosus* tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) durante 21 días. La clave de colores ubicada en la parte superior muestra los valores de Log<sub>2</sub>FC de los genes expresados diferencialmente (FDR<0.01), mostrando en color cyan genes sobre regulados y en color rojo genes sub regulados. Clústers graficados en cajas de colores muestran agrupación de genes con posible co-expresión. Dendrograma muestra relación entre la expresión diferencial de genes

entre tratamientos por medio de una agrupación jerárquica. A lado derecho se muestran los clústers con enriquecimiento funcional (Top 3 de GO o KO) con más de 5 genes participando en el proceso biológico o ruta metabólica (C=clúster). Barras negras indican el porcentaje de genes que participan en el proceso biológico o ruta metabólica correspondiente. Círculos de colores muestran el color del clúster correspondiente a la gráfica del heatmap. T1: *V. parahaemolyticus* 1D + *V. alginolyticus* 1D, T2: *V. parahaemolyticus* 7C + *V. alginolyticus* 7C, T3: Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D, T4: *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C, T5: VidatoX<sup>®</sup> 31C, C1: Etanol 1C..... 73

**Figura 23.** Gráfica heatmap que muestra la agrupación jerárquica de la expresión diferencial de los transcritos en branquia de juveniles de almeja Catarina *Argopecten ventricosus* tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) durante 21 días. La clave de colores ubicada en la parte superior muestra los valores de Log<sub>2</sub>FC de los genes expresados diferencialmente (FDR<0.01), mostrando en color cyan genes sobre regulados y en color rojo genes sub regulados. Clústers graficados en cajas de colores muestran agrupación de genes con posible co-expresión. Dendrograma muestra relación entre la expresión diferencial de genes entre tratamientos por medio de una agrupación jerárquica. A lado derecho se muestran los clústers con enriquecimiento funcional (Top 3 de GO o KO) con más de 5 genes participando en el proceso biológico o ruta metabólica (C=clúster). Barras negras indican el porcentaje de genes que participan en el proceso biológico o ruta metabólica correspondiente. Círculos de colores muestran el color del clúster correspondiente a la gráfica del heatmap. T1: *V. parahaemolyticus* 1D + *V. alginolyticus* 1D, T2: *V. parahaemolyticus* 7C + *V. alginolyticus* 7C, T3: Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D, T4: *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C, T5: VidatoX<sup>®</sup> 31C, C1: Etanol 1C..... 74

**Figura 24.** Patrones de expresión de clústers en manto y branquia con enriquecimiento funcional utilizando la base de datos Gene Ontology (GO) y Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KO). Transcritos regulados por efecto de compuestos bioactivos altamente diluidos e involucrados en procesos biológicos o rutas metabólicas enriquecidas se graficaron en líneas de color gris. Línea color rojo expresa el comportamiento promedio de los datos..... 75

**Figura 25.** Heatmap que muestra la expresión diferencial de transcritos asociados a la respuesta inmune en branquia y manto de juveniles de almeja Catarina *Argopecten ventricosus* tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs). Los genes expresados diferencialmente se agruparon por categorías de rutas metabólicas en las cuales participan. En color cyan se observan genes sobre regulados y en color rojo genes sub regulados. T1: *V. parahaemolyticus* 1D + *V. alginolyticus* 1D, T2: *V. parahaemolyticus* 7C + *V. alginolyticus* 7C, T3: Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D, T4: *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C, T5: VidatoX<sup>®</sup> 31C, C1: Etanol 1C..... 77

**Figura 26.** A) Validación del transcriptoma utilizando RT-qPCR seleccionando genes expresados diferencialmente en el análisis transcriptómico de juveniles almeja Catarina *Argopecten ventricosus* tratados compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) durante 21 días. B) Regresión lineal entre genes expresados diferencialmente utilizando el valor de Log<sub>2</sub>FC obtenido en el análisis transcriptómico (RNA-Seq) y RT-qPCR en manto y branquia. T1: *V. parahaemolyticus* 1D + *V. alginolyticus* 1D, T2: *V. parahaemolyticus* 7C + *V. alginolyticus* 7C, T3: Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D, T4: *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C, T5: VidatoX<sup>®</sup> 31C, C1: Etanol 1C. Los asteriscos (\*) muestran diferencias significativas entre control y tratamiento de cada gen (Prueba t de student independiente P<0.05). ..... 79

**Figura 27.** Rutas metabólicas asociadas a respuesta inmune reguladas por efecto de los compuestos bioactivos altamente diluidos en juveniles de almeja Catarina *Argopecten ventricosus*, y seleccionadas para su validación por RT-qPCR. En color cyan se observan los transcritos sobre-regulados y en rojo los transcritos sub-regulados. Asterisco (\*) muestra genes seleccionados para la validación de la ruta metabólica. Los genes expresados diferencialmente se agruparon por categorías de rutas metabólicas en las cuales participan. T1: *V. parahaemolyticus* 1D + *V. alginolyticus* 1D, T2: *V. parahaemolyticus* 7C + *V. alginolyticus* 7C, T3: Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D, T4: *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C, T5: VidatoX<sup>®</sup> 31C, C1: Etanol 1C..... 81

**Figura 28.** Expresión relativa de los genes TLR6, TLR2, TLR3 y STING en tejido de glándula digestiva, manto y branquia de juveniles de almeja Catarina *Argopecten ventricosus* tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) durante 21 días. Barras muestran promedio e intervalos de confianza al 95%. Letras diferentes muestran diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamiento. T1: *V. parahaemolyticus* 1D + *V. alginolyticus* 1D, T2: *V. parahaemolyticus* 7C + *V. alginolyticus* 7C, T3: Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D, T4: *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C, T5: VidatoX<sup>®</sup> 31C, C1: Etanol 1C, C2: Etanol 1:100, C3: Agua destilada. Las letras muestran diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA  $P < 0.05$ )..... 83

**Figura 29.** Expresión relativa de los genes CAV1, SRC, VPS25 y HEXA en tejido de glándula digestiva, manto y branquia de juveniles de almeja Catarina *Argopecten ventricosus* tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) durante 21 días. Barras muestran promedio e intervalos de confianza al 95%. Letras diferentes muestran diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamiento. T1: *V. parahaemolyticus* 1D + *V. alginolyticus* 1D, T2: *V. parahaemolyticus* 7C + *V. alginolyticus* 7C, T3: Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D, T4: *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C, T5: VidatoX<sup>®</sup> 31C, C1: Etanol 1C, C2: Etanol 1:100, C3: Agua destilada. Las letras muestran diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA  $P < 0.05$ )..... 84

**Figura 30.** Expresión relativa de los genes TRAF3, FILA, CAT, IAP, CYT y HSP90 en tejido de glándula digestiva, manto y branquia de juveniles de almeja Catarina *Argopecten ventricosus* tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) durante 21 días. Barras muestran promedio e intervalos de confianza al 95%. Letras diferentes muestran diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamiento. T1: *V. parahaemolyticus* 1D + *V. alginolyticus* 1D, T2: *V. parahaemolyticus* 7C + *V. alginolyticus* 7C, T3: Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D, T4: *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C, T5: VidatoX<sup>®</sup> 31C, C1: Etanol 1C, C2: Etanol 1:100, C3: Agua destilada. Las letras muestran diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA  $P < 0.05$ )..... 86

**Figura 31.** Rutas metabólicas hipotéticas reguladas en juveniles de almeja Catarina *Argopecten ventricosus* por efecto de compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs), validadas por RT-qPCR. T1: *V. parahaemolyticus* 1D + *V. alginolyticus* 1D, T2: *V. parahaemolyticus* 7C + *V. alginolyticus* 7C, T3: Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D, T4: *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C, T5: VidatoX<sup>®</sup> 31C, C1: Etanol 1C, C2: Etanol 1:100, C3: Agua destilada. Cuadros rojos: genes sub-regulados; Cuadros cyan: genes sobre-regulados; D: glándula digestiva; M: manto; B: Branquia..... 88



## Lista de tablas

<b>Tabla I.</b> Lista de primers usados para validar las rutas metabólicas reguladas por efecto de los CBADs mediante RT-qPCR. pb: tamaño en pares de bases. ....	49
<b>Tabla II.</b> Composición bioquímica de manto, branquia, glándula digestiva y músculo de juveniles de almeja Catarina <i>Argopecten ventricosus</i> tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) durante 21 días. Promedio ± intervalo de confianza al 95%. To: Inicio del experimento, T1: <i>V. parahaemolyticus</i> 1D + <i>V. alginolyticus</i> 1D, T2: <i>V. parahaemolyticus</i> 7C + <i>V. alginolyticus</i> 7C, T3: Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D, T4: <i>Silicea terra</i> <sup>®</sup> 7C + <i>Phosphoricum acidum</i> <sup>®</sup> 7C, T5: VidatoX <sup>®</sup> 31C, C1: Etanol 1C, C2: Etanol 1:100, C3: Agua destilada. Las letras muestran diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA $P < 0.05$ )...58	58
<b>Tabla III.</b> Librerías producto de la secuenciación masiva por tecnología RNA-Seq. RB: Réplica biológica. ....	60
<b>Tabla IV.</b> Número de transcritos expresados diferencialmente comparando todas las condiciones experimentales en tejido de mano y branquia de juveniles de almeja Catarina <i>Argopecten ventricosus</i> tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) durante 21 días, considerando un FDR de 0.01. Sobre: transcritos sobre regulados diferencialmente; Sub: transcritos sub-regulados diferencialmente. T1: <i>V. parahaemolyticus</i> 1D + <i>V. alginolyticus</i> 1D, T2: <i>V. parahaemolyticus</i> 7C + <i>V. alginolyticus</i> 7C, T3: Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D, T4: <i>Silicea terra</i> <sup>®</sup> 7C + <i>Phosphoricum acidum</i> <sup>®</sup> 7C, T5: VidatoX <sup>®</sup> 31C, C1: Etanol C1.....	65

## Abreviaturas

**CBAD:** Compuestos bioactivos altamente diluidos.

**cADN:** Ácido desoxirribonucleico complementario, generado a partir del molde de ARN, mediante la retro-transcripción del ARNm maduro.

**ARN:** Ácido ribonucleico

**RRP:** Receptores reconocedores de patrones (PRR por sus siglas en inglés)

**PAMPs:** Pathogen-associated molecular patterns (Patrones moleculares asociados a patógenos)

**DAMPs:** Damage-associated molecular patterns (Patrones moleculares asociados a daño)

**18S:** ARN ribosomal 18S

**ATP1A1:** Subunidad alfa-like de la ATPasa transportadora de sodio/potasio

**PRKACA:** Subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de cAMP

**TRAF3:** Factor 3 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral

**FILA:** Filamina A

**CAT:** Catalasa

**CAV1:** Caveolina 1

**HEXA:** Hexosaminidasa beta

**TLR2:** Receptor toll-like 2

**TLR6:** Receptor toll-like 6

**TLR3:** Receptor toll-like 3

**IAP:** Proteína inhibidora de apoptosis baculoviral

**CYT:** Subunidad I de la citocromo c oxidasa

**HSP90:** Proteína de choque térmico 90

**VPS25:** Proteína 25 asociada al acomodo de proteínas vacuolares

**SRC:** Isoforma X1 del sustrato contractina-like src

**STING:** Estimulador del interferón del retículo endoplasmático

## 1. INTRODUCCIÓN

La producción de moluscos, principalmente representada por bivalvos, genera 15 millones de toneladas anuales a nivel mundial y permite una gran derrama económica en países como China, Vietnam, Japón, República de Corea y Chile, donde el cultivo de estos organismos se lleva a cabo a gran escala (Lucas y Southgate, 2012).

En México, la mayor producción de moluscos bivalvos corresponde al ostión Americano *Crassostrea virginica* en el Golfo de México, cuya pesquería y cultivo, generan un total de 44,000 toneladas anuales. Estrictamente hablando, solamente se producen 4,000 toneladas anuales de ostión derivado de la actividad acuícola directa e independientemente de las actividades de repoblamiento que sustentan las pesquerías acuiculturales (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2013). La mayor producción de moluscos bivalvos corresponde al ostión Japonés o del Pacífico *Crassostrea gigas* y en menor grado al ostión Kumamoto *Crassostrea sikamea* y al ostión de Placer (nativo), *Crassostrea corteziensis* (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2013). Sin embargo, también hay moluscos pectínidos de importancia comercial con gran potencial para ser cultivadas en Baja California Sur, como la almeja Catarina *Argopecten ventricosus*, especie objetivo del presente estudio.

Para incrementar la producción de *A. ventricosus* se hace necesario impulsar la actividad acuícola mediante la producción de semillas en laboratorio, ya que actualmente se registra un descenso en la extracción pesquera de este recurso, posiblemente a consecuencia de una sobre-explotación (Carta Nacional Pesquera, 2018). Desafortunadamente, a pesar de algunos intentos por generar una producción constante de semillas (juveniles) de esta especie, no ha sido posible mantener un suministro oportuno y suficiente a través del tiempo, debido en parte a problemas de mortalidad en larvas y semillas, asociada a la incidencia de agentes patógenos bacterianos y virales (Mazón-Suástegui, 2005). Esta es una de las mayores problemáticas que se presentan a nivel mundial en la producción de semilla de moluscos bivalvos (Guevara-Escamilla *et al.*, 2010; Dubert *et al.*, 2017), lo que ha limitado el desarrollo de la acuicultura en este grupo de organismos. En específico, una de las principales causas de mortalidad en pectínidos es la incidencia de enfermedades

asociadas a la presencia de bacterias oportunistas del género *Vibrio* (Luna-González *et al.*, 2011). Esto debe tomarse en consideración debido a que el incremento de bacterias del género *Vibrio* con alto grado patogenicidad puede aumentar a corto plazo a consecuencia del incremento en la temperatura en el agua de mar, producido por el calentamiento global (Wendling *et al.*, 2014).

Con el fin de reducir la incidencia de eventos de mortalidad causados por bacterias patógenas en el cultivo de moluscos bivalvos, una de las prácticas más comunes en la actualidad es el uso profiláctico de antibióticos y la aplicación de agentes desinfectantes, que tiene por fin reducir la cantidad de bacterias patógenas en los cultivos larvarios y durante la preengorda de semillas. Sin embargo, el uso de desinfectantes genera efectos negativos debido a que se pueden producir compuestos tóxicos cuando éstos reaccionan con la materia orgánica presente en el agua de cultivo (Prado *et al.*, 2010). Por su parte los antibióticos actúan sobre diversos mecanismos, entre ellos la interferencia en la producción de proteínas, la replicación de DNA y otros aspectos del metabolismo celular de las bacteria patógenas (Romero *et al.*, 2012). A pesar de ser efectivos en algunos casos, se ha observado que los antibióticos generan daños diversos en los cultivos de moluscos bivalvos debido a que pueden alterar la microbiota gastrointestinal benéfica de los organismos cultivados (Romero *et al.*, 2012) y su uso prolongado puede resultar en la selección de cepas bacterianas cada vez más resistentes a los antibióticos (Gómez-León *et al.*, 2005; Lawrence y Jeyakumar, 2013). Por esta razón, algunos gobiernos y organizaciones en diferentes partes del mundo han restringido el uso de antibióticos en la producción animal (Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008).

En la actualidad se están buscando alternativas sustentables que permitan evitar mortalidades masivas en el cultivo de moluscos bivalvos, y entre ellas podemos mencionar la inmuoestimulación, ya sea aplicando probióticos (Campa-Córdova *et al.*, 2009; 2011; Prado *et al.*, 2010; Abasolo-Pacheco *et al.*, 2017), compuestos derivados de bacterias (toxinas, bacterias inactivadas, fragmentos GpC de ADN bacteriano, componentes de pared celular como beta-glucanos, peptidoglucanos y lipopolisacáridos) (Lin *et al.*, 2011, Meena *et al.*, 2013; Hong *et al.*, 2006), aceites esenciales con propiedades antibacteriales (Romero *et al.*, 2012; Bem *et al.*, 2011),

hormonas/citoquinas, (Bricknell y Dalmo, 2005; Canesi *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2017) y metales nanoparticulados (Tello-Olea *et al.*, 2019).

Entre otras opciones, y como una nueva alternativa, se ha propuesto el uso de compuestos bioactivos altamente diluidos (CBAD), algunos de los cuales son medicamentos homeopáticos con autorización y registro oficial para su uso en seres humanos, en la Secretaría de Salud de México (Secretaría de Salud, 2015). Los CBAD son sustancias altamente diluidas que no generan residuos en el agua tratada (son eco-amigables) y no incrementan la resistencia de las bacterias patógenas, debido a que no se enfocan a matar al patógeno sino a fortalecer los mecanismos de defensa del hospedero (Mazón-Suástegui *et al.*, 2017). Estos tratamientos son relativamente económicos y fáciles de elaborar en relación a los tratamientos quimioterápicos de patente (medicamentos alópatricos).

Por su modo de elaboración y efecto, los CBAD pueden ser catalogados como diluciones homeopáticas, las cuales son consideradas como sistemas clínico-farmacéuticos que utilizan micro-dosis de sustancias derivadas de plantas, minerales o animales, cuyo propósito es estimular una respuesta natural del organismo tratado, y permite a ese organismo enfermo recuperar su equilibrio u homeostasis interna mediante un proceso de auto-curación (Bellavite y Signorini, 2002). En general las formulaciones homeopáticas han sido utilizadas en animales, plantas y humanos, pero también han sido evaluadas mediante pruebas *in vitro* (Bellavite y Signorini, 2002; Bellavite *et al.*, 2014b), arrojando resultados cuantificables en la activación de la respuesta inmune, reducción de estrés, incremento en la asimilación del alimento e incremento en la tasa de crecimiento, cuando son aplicados de manera profiláctica o terapéutica (Muñoz-Ruiz y Castro-Portillo, 1994; Bellavite y Signorini, 2002; Bellavite *et al.*, 2006; Camerlink *et al.*, 2010; Merlini *et al.*, 2014; Dias-Neto *et al.*, 2017). Investigaciones experimentales desarrolladas en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR), han demostrado que algunos CBAD son capaces de fortalecer la respuesta inmune en moluscos, camarones y peces marinos al ser tratados principalmente de manera profiláctica (Mazón-Suástegui *et al.*, 2016a, 2016b, 2017; Ortiz-Cornejo *et al.*, 2017), lo cual ofrece potenciales ventajas en materia de producción acuícola y rentabilidad económica, mediante la prevención de enfermedades.

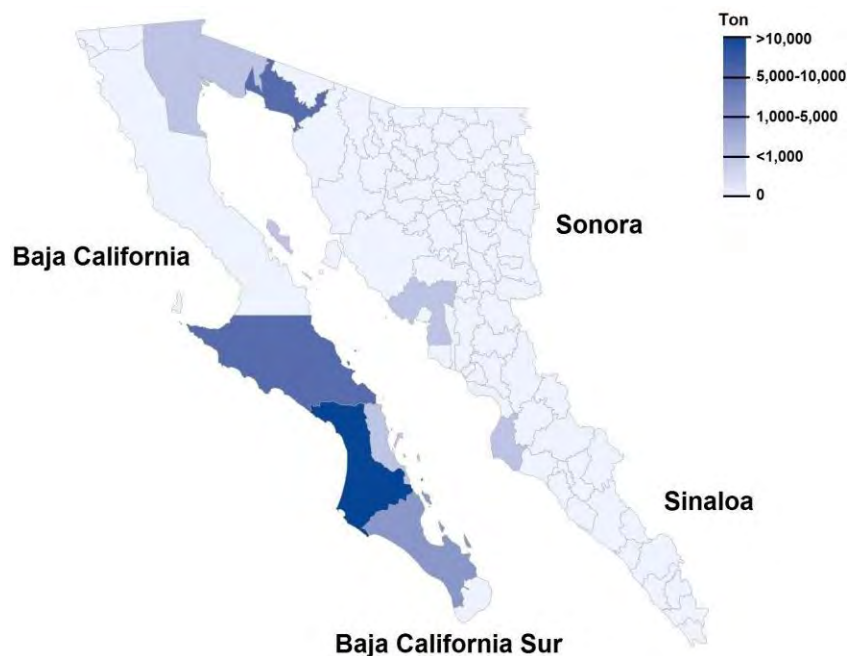
Por lo anteriormente expuesto, la presente investigación ha sido orientada a evaluar el efecto de distintos CBADs en juveniles de la almeja Catarina *A. ventricosus* desde un enfoque fisiológico y transcriptómico. Con ello se busca generar nuevo conocimiento sobre las respuestas biológicas que se desencadenan al emplear estos tratamientos enfocados a fortalecer la respuesta inmune en la especie objetivo, que es considerada altamente susceptible a vibriosis (Luna-González *et al.*, 2011).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Especie Modelo

La almeja Catarina *A. ventricosus* es un molusco bivalvo de importancia comercial perteneciente a la familia Pectinidae, que presenta una amplia distribución geográfica, desde la Laguna de Guerrero Negro y todo el Golfo de California en México, hasta el sur de La Paita, Perú. Su hábitat comprende fondos arenosos, areno fangosos y pastos marinos (Carta Nacional Pesquera, 2018), tiene un ciclo de vida corto y una alta tasa de crecimiento (Brand, 2006).

Esta almeja presenta una concha biconvexa, fuertemente inflada; la valva izquierda presenta de 16 a 22 costillas radiales redondeadas y estrechas; la valva derecha presenta un número similar de costillas radiales con espacios intermedios angostos; la concha en su exterior presenta un color entre gris y blanco a café; el interior de la valva derecha normalmente se encuentra teñido de un color café o morado y alcanza una altura máxima de 95 mm (Coan *et al.*, 2000).



**Figura 1.** Producción acumulada (toneladas) de almeja Catarina (*Argopecten ventricosus*) entre los años 2006 y 2014 (Base de datos extraídos de <http://www.conapesca.gob.mx>, octubre 2020).

La pesquería de este recurso es muy variable debido a factores ambientales y a la facilidad con la que se desplaza esta especie. Su extracción se ha documentado en los municipios de Comondú, Mulegé, La Paz y Loreto en el estado de Baja California Sur; Mexicali en Baja California; Puerto Peñasco, San Luis y Guaymas en Sonora; y Ahome en Sinaloa. El municipio de Comondú es el mayor productor en todo México (Fig. 1). El principal producto comercializable es el musculo abductor o “callo” y en menor grado se consume el molusco completo precocido. La mayor producción de callo fue registrada en 1990, con un total de 3,000 toneladas de callo, equivalentes a 30,000 toneladas de peso fresco con concha (Carta Nacional Pesquera, 2018); sin embargo, esta producción no ha sido alcanzada nuevamente y la explotación del recurso ha ido en descenso. En la carta nacional pesquera se recomienda no incrementar el esfuerzo pesquero, por lo que no es factible incrementar la producción sin apoyo de la acuicultura. Algunos de los cultivos que actualmente existen dependen de la producción de fijaciones (pre-semillas) en laboratorio y otros son dependientes de fijación de semilla en campo. Todos estos proyectos se realizan a escala pequeña en la costa sudcaliforniana del Pacífico en localidades como Rancho Bueno, B.C.S. y en Bahía de La Paz, B.C.S (Noroeste Sustentable A.C.). Este último proyecto y otros de baja escala realizados en Bahía Magdalena, B.C.S., han sido apoyados por la empresa Acuicultura Robles S.P.R. mediante el suministro de pre-semillas. Este proceso implica la producción de larvas, su asentamiento en fibras de plástico, preengorda inicial y su transporte a los sitios de engorda, donde concluye el proceso de preengorda en artes de cultivo suspendidos en línea larga y se inicia la etapa de engorda en fondo o en suspensión (Mazón-Suástegui, 2005).

Aunque se tiene conocimiento y experiencia previa en el manejo de reproductores, larvas y juveniles de pectínidos en condiciones de laboratorio (Uriarte *et al.*, 2001; Mazón-Suástegui, 2005), la producción de juveniles, en este caso de *A. ventricosus*, se ha visto limitada por mortalidades causadas por patógenos presentes en el agua de cultivo, lo que genera una producción inestable en el tiempo. Desafortunadamente, los productos convencionalmente utilizados para combatir patógenos en la acuicultura tradicional, han generado una serie de problemáticas que hacen indispensable optar por tratamientos alternativos enfocados a fortalecer el sistema inmune de los organismos en lugar de erradicar al patógeno, y así contribuir a resolver de manera



duradera y eco-amigable la problemática causada por la alta incidencia de patógenos y sus mortalidades asociadas.

## **2.2 Mecanismos de defensa en moluscos bivalvos: sistema inmune**

Una de las principales tendencias actuales en la acuicultura es incrementar la producción de organismos en el menor espacio posible. Esto se traduce en cultivos intensivos en alta densidad, que incrementan el nivel de estrés en los organismos, y los hace más susceptibles a las enfermedades. La intensificación, contribuye también a un incremento en la producción de materia orgánica, lo que favorece el afloramiento de bacterias patógenas, principalmente las del género *Vibrio*, que presentan alta patogenicidad en pectínidos como *A. ventricosus* (Luna-González *et al.*, 2011). En lo general, este tipo de bacterias predominan en el cultivo intensivo de moluscos bivalvos. (Luna-González *et al.*, 2011; Travers *et al.*, 2015).

La búsqueda de tratamientos alternativos que fortalezcan el sistema inmune y permitan producir organismos más resistentes a las enfermedades, hace indispensable entender primeramente los mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos y en general, de los organismos cultivados. Los vertebrados desarrollaron evolutivamente un sistema inmune adaptativo (adquirido) que se distingue por tener especificidad y memoria inmunológica derivada de la producción de anticuerpos que dirigen una respuesta específica hacia los antígenos reconocidos (Vargas-Albores y Barracco, 2001). En cambio, los moluscos bivalvos presentan un sistema innato de defensa y se dice que carecen de un sistema inmune adaptativo, lo que se traduce en una respuesta no específica (Song *et al.*, 2010). Sin embargo, estudios recientes sugieren que los organismos invertebrados (incluyendo moluscos), pueden reconocer entre distintos patógenos y generar una respuesta específica y diferenciada que es regulada a nivel molecular por efecto de “*splicing* alternativo” (Kurtz y Armitage, 2006; Rowley y Powell, 2007; Wang *et al.*, 2013).

El sistema inmune de los moluscos bivalvos se localiza principalmente en la hemolinfa (hemocitos), por ser un vehículo ideal para movilizarse por todo el organismo (Vargas-Albores y Barracco, 2001), y se encuentra integrado principalmente por hemocitos,

proteínas plasmáticas y reacciones que involucran diversos componentes celulares y humorales (Song *et al.*, 2010; Luna-González *et al.*, 2011). La primera barrera de contacto que poseen estos organismos para evitar el ingreso de un patógeno es principalmente el tejido epitelial y sus secreciones mucosas, en las cuales se encuentran presentes células epiteliales consideradas como la primera línea de defensa contra invasores orgánicos, inorgánicos y patógenos. Las células epiteliales son capaces de introducir partículas bióticas y abióticas (endocitosis), reconocer agentes no-propios y activar mecanismos de señalización para atraer hemocitos (Allam y Raftos, 2015; Günther y Seyfert, 2018). Si una bacteria es capaz de cruzar la primer barrera de defensa, el organismo es a su vez, capaz de reconocer agentes extraños por medio de un mecanismo específico de reconocimiento presente en hemocitos, y desencadenar una serie de señalizaciones en cascada para actuar sobre el cuerpo extraño y eliminar el peligro que el mismo representa (Le Bris *et al.*, 2015).

Los principales mediadores en los mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos son los hemocitos (Canesi *et al.*, 2002), y éstos han sido clasificados con base a sus diversas formas (según autores) y familias de moluscos bivalvos. En *Mytilus edulis* los hemocitos se pueden clasificar en dos tipos: hialinocitos y granulocitos. En *Ostrea edulis* se han subdividido en granulocitos, hialinocitos grandes y hialinocitos pequeños (Canesi *et al.*, 2002), mientras que en pectínidos solo se han observado hialinocitos y semigranulocitos (Estrada *et al.*, 2013) mas no granulocitos (Hine, 1999; Vargas-Albores y Barracco, 2001). Cabe mencionar que a los granulocitos se les atribuye una mayor actividad de fagocitosis y de estallido respiratorio (Canesi *et al.*, 2002, Wang *et al.*, 2017), por lo que se cree que en moluscos pectínidos los hemocitos semigranulares podrían tener una actividad similar a la que tienen los granulocitos en otras familias de bivalvos.

Entre las funciones de la respuesta inmune de los hemocitos, podemos citar a las relacionadas con 1) respuesta inflamatoria, 2) fagocitosis, 3) encapsulación y 4) agregación. La respuesta inflamatoria hace referencia a la migración de hemocitos y proteínas plasmáticas al lugar de la infección. En este proceso se lleva a cabo la destrucción o la reparación del tejido dañado y el aislamiento y eliminación del agente extraño (Novoa *et al.*, 2011). Los hemocitos proveen a los organismos de una defensa localizada regida principalmente por fagocitosis, que involucra procesos de

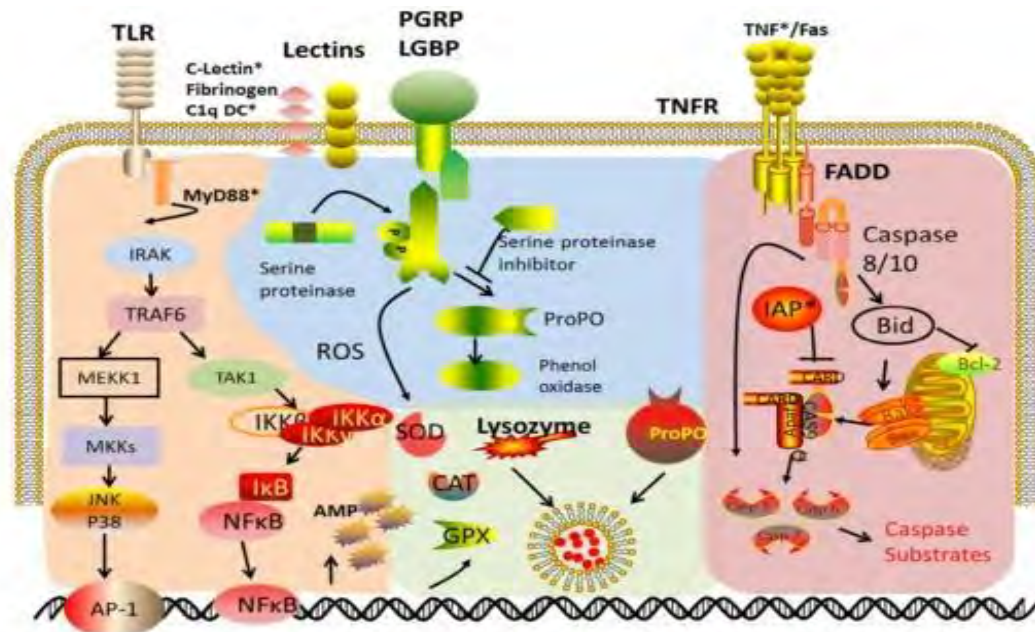
reconocimiento, unión, internalización (formación de pseudópodos o invaginación) y destrucción del patógeno o agente extraño (Canesi *et al.*, 2002). Una vez fagocitado, el agente extraño puede ser 1) eliminado por evacuación, un proceso por el cual el hemocito se mueve a través de las barreras epiteliales hasta el lumen digestivo y excretor para expulsar al agente extraño (Galimany *et al.*, 2008) o 2) destruido dentro de las vacuolas fagocíticas conocidas como fagosomas por medio de enzimas hidrolíticas (proteasas, glucosidasas, fosfatasas, lipasas y esterases) (Pipe, 1990; López *et al.*, 1997), enzimas oxidativas (Fenoloxidasa, Lisozima) (Hine, 1999; Luna-González *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2017), especies reactivas de oxígeno (anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo, ácido hipocloroso) (Hine, 1999; Wang *et al.*, 2017) y péptidos antimicrobianos (Mysticinas, Defensinas, Mytilinas) (Canesi *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2010; Bachère *et al.*, 2015).

Si el número de agentes extraños es elevado, y la fagocitosis por sí sola no puede eliminarlos, se produce un proceso de agregación en el cual actúan hemocitos y células no fagocíticas para encerrar componentes extraños y proceder a su eliminación (Novoa *et al.*, 2011). Cuando la molécula o patógeno es muy grande para ser fagocitado, se lleva a cabo un proceso de encapsulación mediante el cual los hemocitos rodean al agente extraño y posteriormente se genera un depósito de fibroblastos, para proceder a la eliminación del cuerpo extraño (Cáceres-Martínez *et al.*, 2011; Novoa *et al.*, 2011). Recientemente se ha descrito la liberación extracelular de histonas antimicrobiales (ETosis), la cual es desencadenada por especies reactivas de oxígeno (EROS), en respuesta a la presencia de patógenos (Bachère *et al.*, 2015).

Debido a la íntima interacción que hay entre hemocitos y el mecanismo de defensa de los moluscos bivalvos, un incremento en el contenido de hemocitos ha sido utilizado como indicador de la activación de la respuesta inmune. En especies de bivalvos como *Ruditapes philippinarum*, *R. decussatus*, *Mercenaria mercenaria* y *Crassostrea virginica*, se ha observado un incremento en el conteo de hemocitos asociado a la presencia de bacterias patógenas (Allam *et al.*, 2006), pero esto también se ha atribuido a la detección de daño celular, exposición a nanopartículas, presencia de toxinas, reabsorción de gónada, acarreo de nutrientes y mineralización de la concha (Mount *et al.*, 2004; Kádár, 2008; Song *et al.*, 2010; Moyano *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Prego-Faraldo *et al.*, 2017). Por lo anterior, este tipo de células pueden ser utilizadas

como indicadores del estado fisiológico y de la respuesta inmune de los moluscos bivalvos.

Para poder tener una respuesta oportuna ante un agente extraño, el organismo requiere de algún tipo de señalización que permita reconocer moléculas u organismos potencialmente dañinos. En moluscos bivalvos se han identificado siete grupos de Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRR), encargados de reconocer señales de peligro como los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS, por sus siglas en inglés), patrones moleculares asociados a daño (DAMPS, por sus siglas en inglés) y patrones moleculares asociados a nanomateriales (NAMPS, por sus siglas en inglés) (Silva *et al.*, 2017). Estas señales son capaces de desencadenar la respuesta inmune. Particularmente, los mecanismos de reconocimiento permiten a los organismos discriminar entre los agentes extraños y los componentes propios (Wang *et al.*, 2013) y desencadenar una respuesta oportuna en contra de agentes patógenos, toxinas, nanopartículas y otros compuestos que sean identificados como potencialmente dañinos (Galimany *et al.*, 2008; Ramírez-Ortiz *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2010; Canesi *et al.*, 2012; Mello *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2017).



**Figura 2.** Rutas de señalización relacionadas con la activación de la respuesta inmune en moluscos bivalvos (Imagen tomada de Gómez-Chiarri *et al.*, 2015b). AMP: péptidos antimicrobianos; AP-1: proteína activadora 1; AVNV: necrosis viral aguda; bax: regulador de apoptosis; bax; Bcl-2: regulador de apoptosis Bcl-2; bid: agonista del

dominio de muerte BH3; C1qdc: dominio reclutador de C1q; CARD: domino activador y reclutador de caspasas; CAS9: caspasa 9; CAT: catalasa; FADD: proteína fas asociado al dominio de muerte; Freps: proteína relacionada a fibrinógenos; GPX: glutatión peroxidasa ; IAP: proteína inhibidora de apoptosis; IKK: IκB quinasa; JNK: C-Jun N-terminal quinasa; LGBP: proteína con unión a LPS y -1,3 glucano; MEKK1: proteína activada por MAP; MKK: MAPK quinasa; Myd88: modulador de respuesta proinflamatoria mieloide 88; NF-κB: factor nuclear kappa B; PGRP: proteína reconocedora de peptidoglicanos; Propo: pro-fenoloxidasa; ROS: especies reactivas de oxígeno; SOD: superóxido dismutasa; Srs: receptores basura ricos en cisteína; TAK1: factor de crecimiento transformante activado por B quinasa.

El mecanismo de reconocimiento de señales de peligro permite al organismo amenazado responder directamente al estímulo o activar la ruta de señalización en cascada correspondiente, siendo ésta última, la alternativa utilizada con mayor frecuencia (Wang *et al.*, 2013). El proceso de reconocimiento es clave para la señalización en cascada. Entre los 7 grupos de PRR podemos mencionar: 1) Proteínas de Reconocimiento de Peptidoglicanos, 2) Proteínas de Unión a Gram-Negativas, 3) Lectinas Tipo-C, 4) Galectinas, 5) Proteínas que contienen Thioester, 6) Receptores "basura" (scavenger-receptors) y 7) Receptores Toll-like (Song *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013). Dentro del citosol podemos mencionar a la familia de los receptores STING, asociados a la detección de vita-PAMPs y a los receptores node-like (NLR) que son PRR capaces de reconocer toxinas, nanopartículas y especies reactivas de oxígeno (entre otras señales de peligro), que son internalizadas mediante procesos de fagocitosis o difusión y están involucrados en la activación del inflamosoma, un complejo de proteínas en el citosol, asociadas a la activación de la respuesta pro-inflamatoria e inmune (Mariathasan *et al.*, 2006; Dostert *et al.*, 2008; Caicedo *et al.*, 2009; Franchi *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2017).

En moluscos bivalvos se han encontrado evidencias que sugieren la presencia de seis modelos de señalización, entre los que podemos mencionar la ruta de señalización Toll-like (Bassim *et al.*, 2015), la señal/quinasa Janus transductora y activadora de transcripción (JAK-STAT) (Song *et al.*, 2010), el activador-mitogeno de la proteína quinasa (MAPK) (Bassim *et al.*, 2015), la ruta NF-κB (López-Bojorquez, 2004), rutas complementarias (Song *et al.*, 2010) e inflamosoma (Franchi *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2017), y modelos involucrados con la activación de la respuesta inmune (Fig. 2). Estos modelos se encargan de hacer llegar las señales que permitirán generar una respuesta

inmune contra el ataque de algún agente extraño. Entre los procesos involucrados se incluyen la fosforilación, la producción de citoquinas (ej. interleuquinas), la activación de factores de transcripción y la ubiquitinación, entre otros (Moreira *et al.*, 2014).

Una vez que se lleva a cabo el reconocimiento del agente extraño y se activa la cascada de señalización, se sintetizan moléculas capaces de eliminar agentes extraños “invasores” del organismo huésped, o de contrarrestar su efecto nocivo (Song *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013). Estas moléculas son conocidas como efectores del sistema inmune (Song *et al.*, 2010). Estos efectores son producidos de diferente manera dependiendo de la ruta que haya sido activada; entre ellos se incluyen lectinas (su función se asemeja a la de un anticuerpo), hemaglutinas y opsoninas, encargadas de llevar a cabo procesos como reconocimiento y aglutinación (Novoa *et al.*, 2011), péptidos antimicrobianos (miticinas, mitilinas y defensinas) (Wang *et al.*, 2013; Bachère *et al.*, 2015), lisozima (proteína hidrolítica que rompe el enlace glicosídico en peptidoglicanos), fenoloxidasa, involucrada en el proceso de melanización (Söderhäll y Cerenius, 1998, Cerenius *et al.*, 2008), proteasas e inhibidores de proteasas (Novoa *et al.*, 2011), enzimas hidrolíticas localizadas principalmente en células lisosomales (Estrada *et al.*, 2007), especies reactivas de oxígeno producidas por el estallido respiratorio (péroxido de hidrógeno, radical hidroxilo, anión superóxido, ácido hipocloroso y oxígeno simple), especies reactivas de nitrógeno (peroxinitrito) (Luna-González *et al.*, 2011) y enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa (Canesi *et al.*, 2012; Gómez-Chiarri *et al.*, 2015b). En conjunto, estos efectores permiten a los moluscos bivalvos auto-defenderse, eliminar al agente invasor externo y contrarrestar el efecto negativo que produce el estrés oxidativo causado durante el proceso de destrucción del patógeno.

Entender el conjunto de respuestas humorales y celulares, que involucran un proceso complejo de reconocimiento y señalización en moluscos bivalvos permite comprender mejor el efecto de potenciales agentes inmunomoduladores, como sería el caso de los compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs), y conocer con mayor detalle y a mayor profundidad, sus efectos e interacciones específicas con los organismos tratados.

### **2.3 Inmunomoduladores: CBADs como alternativa para fortalecer el sistema inmune en moluscos bivalvos**

La aplicación de inmunoestimulantes se ha propuesto con el fin de generar una actividad acuícola sustentable y eco-amigable, evitando el uso y abuso de agentes químicos, incluyendo los antibióticos, (Prado *et al.*, 2010). Los inmunoestimulantes, que también reciben el nombre de adyuvantes o modificadores de respuesta biológica, actúan mediante la activación del sistema inmune e incrementan la capacidad del organismo tratado para resistir diversas enfermedades (Wang *et al.*, 2017). Los inmunoestimulantes pueden ser definidos como compuestos naturales capaces de modular el sistema inmune, incrementando la resistencia del hospedero en contra de patógenos (principalmente bacterias), que causan enfermedades (Bricknell y Dalmo, 2005). Sin embargo, los inmunoestimulantes no solo tienen la capacidad de modular la respuesta inmune sino que pueden también influir en algunos parámetros fisiológicos. Para citar un ejemplo, en varios estudios se ha reportado que ciertos inmunoestimulantes como los beta-glucanos, pueden incrementar el crecimiento de los organismos, además de activar la respuesta inmune (Wang *et al.*, 2017).

Hasta ahora, el uso de inmunoestimulantes se considera una de las estrategias más novedosas en la acuicultura, ya que permiten fortalecer los mecanismos de defensa celular y humoral (Meena *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2017). Estos compuestos pueden ser divididos principalmente en dos categorías: los que son específicos y proporcionan una actividad antigénica específica en la respuesta inmune y los no específicos (presentes en moluscos bivalvos por no tener una respuesta inmune adaptativa), que se cree estimulan diversos componentes del sistema inmune sin una especificidad antigénica (Ganguly *et al.*, 2010). Según su procedencia, los inmunoestimulantes pueden ser clasificados en diversos grupos: derivados de bacterias como toxinas, bacterias inactivadas, GpC, y componentes de la pared celular como beta-glucanos, peptidoglicanos y lipopolisacáridos (Hong *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2011, Meena *et al.*, 2013) factores nutricionales como prebióticos y carotenos (Luna-González *et al.*, 2011; Ganguly *et al.*, 2010), hormonas/citoquinas (Bricknell y Dalmo, 2005; Canesi *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2017) y metales nanoparticulados (Tello-Olea *et al.*, 2019).

Los inmunoestimulantes permiten incrementar la actividad de fagocitosis, explosión respiratoria, producción de radicales libres (Oyanedel *et al.*, 2016), actividad de enzimas oxidantes (Hong *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2011) y antioxidantes (Lin *et al.*, 2011), favorecen la destrucción de bacterias e incrementan la citotoxicidad y la actividad lisosomal (Bricknell y Dalmo, 2005; Ganguly *et al.*, 2010). Esto es válido cuando son adicionados en concentraciones adecuadas dependientes de cada organismo y de su condición fisiológica, ya que se ha observado que su aplicación excesiva trae como consecuencia un agotamiento de la respuesta inmune (Lin *et al.*, 2011) o una reacción exacerbada que termina en un daño celular del hospedero.

Los inmunoestimulantes pueden ser suministrados en forma de medicamentos, como los CBADs, o de nutrientes (Ganguly *et al.*, 2010) y son altamente dependientes de los receptores objetivo de las células que se encargan de reconocerlos como señales de peligro. Su reconocimiento desencadena una serie de señalizaciones en cascada para activar rutas de defensa del sistema inmune innato del organismo. Algunas sustancias como beta-glucanos, nanopartículas, toxinas, productos de bacterias y constituyentes de plantas pueden ser reconocidas por receptores y activar directamente mecanismos del sistema inmune innato (Galimany *et al.*, 2008; Prado *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2010; Canesi *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2017).

Los CBAD han surgido como una nueva alternativa que ha mostrado tener un efecto inmunomodulador en organismos marinos como peces, camarón y almejas (Ortiz-Cornejo *et al.*, 2017), que por sus procesos de formulación (dilución seriada con procesos de dinamización) pueden clasificarse como productos similares a los medicamentos homeopáticos.

La medicina homeopática, en la cual se pueden incluir los CBADs, es un sistema clínico-farmacéutico basado en dosis mínimas (Bellavite y Signorini, 2002) y el principio de los similares el cual involucra un efecto de dosis-respuesta denominado hormesis (Bell *et al.*, 2013). El efecto de hormesis se caracteriza por generar una respuesta bifásica a estresores, donde dosis altas de una sustancia (toxina, metal, mineral, patógeno) causan una actividad nociva en el sistema biológico y en contra parte, dosis bajas (ultradiluidas y agitadas) de la misma sustancia, producen una actividad benéfica para el sistema biológico (Endler *et al.*, 2015).



Es importante destacar que la aplicación de un agente estresor o estimulante (ej. endotoxina) juega un papel muy importante en la activación de la respuesta inmune innata. Concentraciones muy bajas de un agente estresor como los PAMPs y DAMPs pueden no desencadenar un proceso de respuesta inmune, mientras que concentraciones bajas pueden desencadenar un proceso de activación inmunológica moderada o de “entrenamiento” (Bauer *et al.*, 2018). Por otra parte, dosis altas del agente estresor pueden generar un efecto de desensibilización (tolerancia), y dosis muy altas generan un efecto exacerbado de la respuesta inmune lo que se traduce en un daño para el hospedero (Bauer *et al.*, 2018). Todo esto es producto de una respuesta bifásica conocida como el efecto de hormesis (Bell *et al.*, 2013). Adicionalmente, la concentración del agente estresor que permite tener una reacción de sensibilización o tolerancia a cierto agente externo, puede también explicarse desde el punto de vista del gasto energético. Cuando el estímulo de la respuesta inmune es bajo, por consecuencia el gasto energético es igualmente bajo y se genera un efecto de sensibilización. Sin embargo, si el estímulo es alto, el gasto energético es también elevado, y debido a que el organismo requiere de energía para el mantenimiento de sus procesos fisiológicos esenciales, se genera una respuesta de desensibilización para evitar un déficit de energía (Bauer *et al.*, 2018).

Para la formulación de los medicamentos homeopáticos, incluyendo los CBAD, se utilizan preferentemente sustancias derivadas de plantas, minerales o animales, altamente diluidas y dinamizadas (mediante agitación enérgica o “sucusión”), que pueden suministrarse de manera profiláctica y/o terapéutica, cuyo propósito es estimular una respuesta natural del individuo tratado. A diferencia de los antibióticos, los medicamentos homeopáticos no atacan directamente al patógeno, sino que mejoran la condición fisiológica y fortalecen el sistema inmune del organismo tratado (Bellavite y Signorini, 2002). En otras palabras, los medicamentos homeopáticos buscan fortalecer el sistema inmune de los organismos tratados y promueven una autorregulación equilibrada para recuperar su homeostasis dinámica natural, que es equivalente a un estado de buena salud, mientras que la pérdida de dicha homeostasis es sinónimo de enfermedad.

El efecto causado por los medicamentos homeopáticos, principalmente aquellos que se encuentran altamente diluidos más allá de la 12<sup>a</sup> dilución serial centesimal (12C), ha sido ampliamente criticado, ya que en opinión de algunos críticos, al utilizar altas diluciones no se puede atribuir la respuesta del organismo tratado a una cantidad cuantificable del compuesto o “principio activo” del medicamento. De acuerdo con la teoría de Avogadro, un mol contiene  $6.022 \times 10^{23}$  moléculas, lo que implica que diluciones mayores a la 12<sup>a</sup> centesimal (12C) ( $1 \times 10^{-24}$ ), tienen una probabilidad casi nula de contener una sola molécula del compuesto original, de lo que en la medicina galénica (Alopatía) se denomina “principio activo”.

A pesar de que lo anterior genera duda razonable, se ha demostrado científicamente la presencia de nanopartículas en medicamentos homeopáticos altamente diluidos (Chikramane *et al.*, 2012 a, 2012b), lo cual ha sido atribuido a un almacenamiento de las nanopartículas por efecto de flotación en la interfase que existe entre la solución y el aire contenido en el recipiente. Otros autores han demostrado mediante microscopía óptica, resonancia magnética nuclear, conductimetría, espectroscopia de infrarrojo y termoluminiscencia, que los medicamentos homeopáticos difieren de una simple solución acuosa y que esa diferencia puede deberse al proceso de agitación o sucusión (dinamización) del principio activo contenido en alta concentración en la solución inicial o tintura madre (TM) (Aabel *et al.*, 2001; Drost-Hansen, 2001; Sukul *et al.*, 2005; Van Wijk *et al.*, 2006; Rey, 2007; Demangeat, 2009; Elia *et al.*, 2012; Kokornaczyk *et al.*, 2020).

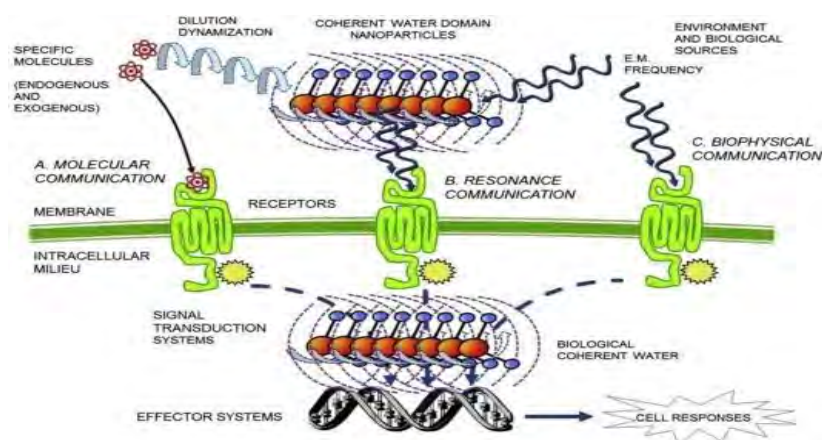
Para explicar lo anterior, se han propuesto diversos mecanismos mediante los cuales, las propiedades de las moléculas originales (principio activo), quedan almacenadas en el medicamento homeopático durante el proceso secuencial de dilución-agitación. Entre las hipótesis más aceptadas están: 1) La formación de “clústers” constituidos por moléculas de hidrógeno y oxígeno, los cuales se organizan para adquirir y conservar las propiedades físicas de la molécula original, aun después de las diluciones seriales (Bellavite *et al.*, 2014a), 2) La formación de “dominios coherentes”, en los cuales las moléculas de agua conservan la estructura de la molécula original, al vibrar en una frecuencia común, bien definida, que permite conservar un campo electromagnético (Bellavite *et al.*, 2014a) y 3) La presencia del compuesto altamente diluido o la formación de “nanopartículas”, cuya presencia ha sido confirmada en diluciones 15<sup>a</sup>

centesimales (15C), y su formación es atribuida al efecto de la dinamización (dilución + agitación o sucusión), las cuales decrecen en su tamaño conforme la dilución aumenta (Upadhyay y Nayak, 2011). Cabe señalar que al igual que los medicamentos homeopáticos, las nanopartículas no tienen un efecto lineal sobre la respuesta inmune de los organismos y que su efecto depende ampliamente de sus propiedades físicas como tamaño y forma (Bell *et al.*, 2013; Bellavite *et al.*, 2014b; Bell y Schwartz, 2015).

El modo convencional por el cual existe una comunicación dentro de los sistemas biológicos, ocurre por el reconocimiento de moléculas mediante mecanismos receptores que poseen todos los seres vivos. Estas moléculas pueden, aun en muy baja concentración, desencadenar una cascada de señalizaciones y activar una respuesta biológica específica. Sin embargo, los modelos de comunicación mediante los cuales actúan los medicamentos homeopáticos son diversos y dependen del grado de dinamización (dilución/sucusión). Diluciones bajas actúan mediante el modelo tradicional de reconocimiento molecular, mientras que en diluciones altas la comunicación con el receptor se atribuye a comunicación por resonancia o comunicación biofísica, (Bellavite *et al.*, 2014b). Independientemente de la dilución, incluyendo aquellas que en teoría ya no contienen la molécula original del concentrado inicial o TM, se sugiere que el medicamento homeopático puede estar interactuando con receptores específicos o incluso directamente con el ADN de manera química o física (Fig. 3).

Se ha establecido que las ondas electromagnéticas pueden ser pieza clave en la transmisión de la señal de compuestos altamente diluidos debido a que se ha observado que proteínas de membrana pueden interactuar con moléculas de agua o clusters facilitando la transferencia de protones (Freier *et al.*, 2011) y al hecho de que se ha detectado un incremento en la conductividad eléctrica en diluciones homeopáticas (Elia *et al.*, 2012). Aunado a lo anterior se ha determinado que una activación de neutrófilos puede ser generada mediante una comunicación meramente física (Thomas *et al.*, 2000). Lo anterior ha sido corroborado mediante la colocación de un tubo con PMA (4-forbol-12-beta-miristato-13-acetato) unido a una bobina y otro tubo con un cultivo de neutrófilos igualmente unido a una bobina. Ambas bobinas se conectaron con un oscilador, y al ser encendido generó la activación de neutrófilos.

En la actualidad existe evidencia científica de que los sistemas biológicos son capaces de codificar señales físicas, y se le ha nombrado “comunicación celular por fotoemisión” (Prasad *et al.*, 2014). Se ha detectado que un sistema celular puede influenciar a otro por medio de radiación electromagnética (foto emisión), mediante la estimulación de la división celular, la activación de neutrófilos y la inducción del estallido respiratorio; sin embargo, aún no se ha establecido con total claridad el mecanismo específico mediante el cual, las células son capaces de reconocer fotones emitidos por células vecinas y también, aquellos fotones emitidos por el entorno (Prasad *et al.*, 2014). Esta evidencia soporta la idea de que los medicamentos homeopáticos, en particular los que están mayormente diluidos, pueden estar actuando por medio de una comunicación física en los organismos, sin necesidad de que exista una sola molécula del “principio activo”, presente en el medicamento ultradiluido y agitado de manera serial, a partir de una TM. Por otra parte, también se ha considerado la interacción causada por la presencia de nanopartículas, las cuales han sido observadas y cuantificadas en ciertos medicamentos homeopáticos, incluso en altas diluciones (Chikramane *et al.*, 2012a, 2012b). La detección de nanopartículas ha sido posible principalmente en aquellos medicamentos formulados a partir de compuestos o de moléculas hidrofóbicas (Moyano *et al.*, 2012). Esta es una característica que presentan los medicamentos homeopáticos formulados a partir de metales, los cuales desencadenan una mayor respuesta del sistema inmune a mayor grado de hidrofobicidad del metal (Moyano *et al.*, 2012).



**Figura 3.** Modelos de reconocimiento de los medicamentos homeopáticos en los sistemas biológicos (Imagen tomada de Bellavite *et al.*, 2014b) según la dilución del compuesto bioactivo.

Actualmente hay artículos científicos publicados que demuestran la eficacia de los medicamentos homeopáticos en plantas, animales y humanos, tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo* (Bellavite y Signorini, 2002; Bellavite *et al.*, 2014b) por ejemplo, Saha *et al.*, (2013) evaluaron por triplicado el efecto de dos medicamentos homeopáticos Condurango 30c y Hydrastis 30c, un control placebo (etanol 30c) y un control negativo (nada adicionado) en cultivos celulares de una línea de células de cáncer cervical utilizando un microarreglo (Affymetrix Gene Chip Human Primeview). Como resultado, estos autores registraron 100 genes que son regulados por efecto de Condurango 30c e Hydrastis 30c, concluyendo que los medicamentos homeopáticos no son consecuencia de “efecto placebo” y sugieren que en cultivos de líneas celulares cancerígenas, no es posible asumir que exista un proceso de sugestión, factor indispensable para que se lleve a cabo el efecto placebo.

Los experimentos *in vitro* han sido utilizados en la investigación científica como modelos inmunológicos para demostrar que existe una respuesta de regulación de células involucradas con el sistema inmune. En macrófagos de ratón tratados con CANOVA<sup>®</sup>, un complejo homeopático utilizado para el tratamiento de casos de sistema inmune deprimido, permite la activación de genes involucrados con la activación de macrófagos (de Oliveira *et al.*, 2008). Davenas *et al.*, (1988) registraron una activación de basófilos con el anticuerpo anti-IgE, utilizando diluciones homeopáticas  $10^{-60}$  y  $10^{-120}$  veces menores a la concentración convencional ( $10^{-3}$  mg mL<sup>-1</sup>) que también demostró ser efectiva. Cuando el anticuerpo anti-IgE fue adicionado a una concentración  $1.66 \times 10^{-16}$  M para activar basófilos, estos quedaron inactivados mediante la aplicación profiláctica de medicamentos homeopáticos formulados a partir de histamina 18c y *Apis mellifica* 10c (0% desgranulación de basófilos) en comparación con el control ( $36.7 \pm 2.4\%$  desgranulación de basófilos), corroborando la acción antiinflamatoria estos tratamientos (Poitevin *et al.*, 1988). El medicamento homeopático *Arnica montana* promueve en macrófagos de humanos, la regulación de genes involucrados en la remodelación de tejido y sub-expresa genes relacionados con procesos inflamatorios (Oliosio *et al.*, 2016). Las diluciones homeopáticas centesimales 3C, 5C y 7C de *Apis mellifica* han demostrado sobre-expresar genes involucrados en procesos que inhiben inflamación y estrés oxidativo en líneas celulares RWPE-1, que son células epiteliales normales de la próstata (Bigagli *et al.* 2014).

En particular los modelos inmunológicos han mostrado ser de gran utilidad para demostrar la actividad de la homeopatía (Bellavite *et al.*, 2006; Bonamin y Bellavite, 2015), ya que la vía específica de acción de diversos medicamentos homeopáticos está relacionada con la regulación de la respuesta inmune de los organismos tratados (Bellavite *et al.*, 2006), y con la conservación de la homeostasis interna frente a eventos de estrés o de enfermedad (Bellavite y Signorini, 2002). Varios resultados han demostrado que los medicamentos homeopáticos fortalecen el sistema inmune, y se ha sugerido que la interacción entre medicamento-organismo se ve reflejada en uno o en varios de los mecanismos de defensa o citoprotección (Bonamin y Bellavite, 2015).

Diversos autores han utilizado plantas (Jäger *et al.*, 2015) y animales (Bonamin *et al.*, 2015) como modelos de estudio, con el fin de demostrar *in vivo* la acción real de algunos medicamentos homeopáticos sobre componentes del sistema inmune. En plantas de fresa Trebbi *et al.*, (2014) observaron que la aplicación semanal mediante un atomizador de los medicamentos homeopáticos formulados a partir de dinamizaciones decimales de azufre (*Sulphur* 6X) y *Horn-equisetum* (6X), permite reducir el nivel de infección causado por el hongo patógeno *Botrytis cinérea*, e incrementar la producción de frutos. Adicionalmente, en experimentos realizados *in vitro* con plantas de caña de azúcar se ha reducido el número de plantas infectadas con *Xanthomonas albilineans* mediante la aplicación de cuatro diferentes medicamentos homeopáticos en dinamización centesimal (*Sulphur* 30C, *Staphysagria* 30C, *Calendula* 30C, *Osillococcinum* 200 C), mientras que en el grupo control (sin tratamiento), se registró una mayor presencia de plántulas contaminadas (García y Villegas, 2014). Estos autores realizaron los ensayos por triplicado con un total de 105 muestras en todo el diseño experimental. En otros estudios han encontrado que los medicamentos homeopáticos actúan sobre el sistema inmune y contribuyen a mantener la homeostasis general de los organismos tratados, directamente asociada con un buen estado de salud y/o ausencia de enfermedad. Scherer-Pongratz *et al.*, (2015) observaron un incremento en el crecimiento del tallo en plantas de trigo (*Triticum aestivium*), cuando las semillas fueron tratadas con dinamizaciones homeopáticas decimales (24X, dilución  $10^{-25}$ ) formuladas a partir de un concentrado de nitrato de plata ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ), en comparación con las semillas del grupo control (agua). Estos autores concluyen que el desarrollo y el crecimiento de las semillas de trigo puede ser mejorado con nitrato de

plata 24X. Aunado a lo anterior, la línea de investigación de homeopatía agrícola en CIBNOR ha sugerido el uso de CBADs como una alternativa para mejorar el cultivo de especies de plantas de importancia comercial como pepino (*Cucumis sativus*), tomate (*Solanum lycopersicum*), frijol (*Phaseolus vulgaris*) y albahaca (*Ocimum basilicum*) (Mazón-Suástegui *et al.*, 2019d).

Por otro lado la aplicación de homeopatía en animales permite el fortalecimiento del sistema inmune y la conservación de homeostasis en los sistemas de los organismos, con lo cual es posible obtener incrementos en crecimiento y reducción de estrés. Entre los animales, el ratón (*Mus musculus*) ha sido el modelo más estudiado para evaluar el efecto de medicamentos homeopáticos. Ferraz *et al.*, (2011) observaron una reducción en parasitemia (presencia de parásitos en el torrente circulatorio) de ratones infectados con el parásito *Trypanosoma cruzi* (1400 tripomastigote organismo<sup>-1</sup>) que fueron tratados previamente durante 7 días con el “nosode” (medicamento homeopático formulado a partir de un patógeno) 7dH formulado a partir de un concentrado del mismo parásito *T. cruzi* (4.1X10<sup>7</sup> tripomastigotes mL<sup>-1</sup>) y administrado a 0.2 mL días<sup>-1</sup> organismo<sup>-1</sup>. Los autores sugieren experimentar con diferentes concentraciones y tiempos de tratamiento ya que aunque observaron una reducción en la parasitemia no se pudo reducir el porcentaje de mortalidad en los ratones infectados. Por su parte Bagai *et al.*, (2012) reportaron una mayor supervivencia en ratones infectados con *Plasmodium berghei* (1X10<sup>6</sup>) cuando fueron tratados con el co-nosode 30C (Malaria Co Nosode [Nd], M/s. S.B.L., India) administrado a 0.2 mL días<sup>-1</sup> organismo<sup>-1</sup> durante un período de 4 días en comparación con el control negativo (agua destilada), pero no se presentó diferencia significativa en el porcentaje de parasitemia, con respecto al control positivo (Chloroquina). En este contexto, se ha concluido que la aplicación de medicamentos homeopáticos permite a los organismos tratados, desencadenar respuestas dirigidas a contrarrestar la sintomatología asociada a una enfermedad específica, y a sobrellevar la invasión del parásito, lo que sustenta la idea de que los medicamentos homeopáticos actúan en el fortalecimiento de la respuesta inmune.

Para el caso particular de organismos acuáticos se tiene muy poca información. En su mayoría, las investigaciones experimentales se han realizado con la especie dulceacuícola *Oreochromis niloticus*, (tilapia del Nilo), y se han reportado incrementos en el diámetro de fibras musculares y supervivencia en peces tratados con el

medicamento homeopático patentado Homeopatila RS<sup>®</sup> (yodo 12CH, extracto de testículo de tilapia 30CH y extracto de hipófisis de carpa 30CH) en comparación al control negativo (etanol 30°) y un control positivo para crecimiento muscular (hormona 17- $\alpha$ -metiltestosterona) (Júnior *et al.*, 2012). Para la misma especie también se ha reportado una reducción en el impacto causado por estrés, e incrementos en el crecimiento de los organismos tratados con otra formulación patentada Homeopatila 100<sup>®</sup> (Merlini *et al.*, 2014), lo cual ha sido confirmado con un menor contenido de cortisol ( $17.19 \pm 0.95 \text{ ng mL}^{-1}$ ) en comparación con los niveles en los organismos del grupo control ( $38.68 \pm 1.21 \text{ ng mL}^{-1}$ ) los cuales fueron tratados solo con alcohol. También se reportan cambios en el metabolismo de lípidos utilizando el medicamento patentado HomeoAqua Mega-3<sup>®</sup> (Andretto *et al.*, 2014) el cual genera un decremento en el contenido de ácidos grasos saturados y de la relación  $\Sigma\text{N-6}/\Sigma\text{N-3}$  en comparación al control (etanol 30°). Otros autores han reportado incrementos en supervivencia y mantenimiento en el crecimiento de organismos tratados con la hormona 17- $\alpha$ -metiltestosterona, cuando se adiciona un complejo homeopático formulado a partir de chamomilla, quina y azufre, durante la masculinización de alevines, proceso en el cual, los peces se ven expuestos a factores estresantes (Dias-Neto *et al.*, 2017). Cabe señalar que estos autores registraron una menor supervivencia cuando la hormona 17- $\alpha$ -metiltestosterona fue administrada sin el complejo homeopático. Lo anterior sustenta los resultados de Merlini *et al.*, 2014 quienes determinaron que los medicamentos homeopáticos ayudaron a reducir el estrés de los organismos, permitiéndoles conservar su balance homeostático.

En lo relativo a especies marinas, recientemente se han publicado los resultados de investigaciones realizadas en CIBNOR con especies de interés comercial y el uso de CBADs, considerados medicamentos homeopáticos (Mazón-Suástegui *et al.*, 2016a, 2016b, 2017, 2018b, 2019a; Ortiz-Cornejo *et al.*, 2017, Rosero-García *et al.*, 2019; López-Carvallo *et al.*, 2020). Al respecto, en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), retado contra *Vibrio parahaemolyticus* se registró una mayor supervivencia en el grupo experimental tratado antes y durante el reto con los CBAD Hel-Mix/Pav-Mix 31CH (58.3%) y Vid-Mix 31CH (50%) en comparación con el grupo control negativo (0%), mientras que el grupo control positivo (el cual no fue retado) registró un 100% de supervivencia (Mazón-Suástegui *et al.*, 2016a). Adicionalmente, los tratamientos que



presentaron mayor porcentaje de supervivencia estuvieron asociados a un incremento en la respuesta inmune. De igual forma, se observaron efectos benéficos con el uso de CBAD en juveniles de pargo Lunarejo (*Lutjanus guttatus*) que mostraron presencia de coccidios intestinales, los cuales tuvieron mayor supervivencia cuando los juveniles fueron tratados con Heel-Mix, reducción de lesiones en tejido de estómago e intestino por efecto de los tratamientos Passival<sup>®</sup>-*Silicea terra*<sup>®</sup>, Passival<sup>®</sup>-*Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> y Endecto<sup>®</sup>-Infecções, y un incremento en reservas de carbohidratos en hígado por efecto de los tratamientos Passival<sup>®</sup> y Passival<sup>®</sup>-*Silicea terra*<sup>®</sup> en comparación con los organismos del grupo control (Mazón-Suástegui *et al.*, 2016b; Rosero-García *et al.*, 2019). También se han realizado estudios experimentales en moluscos bivalvos marinos, como la almeja Catarina (*A. ventricosus*). Juveniles de esta especie fueron tratados con CBADs y con los antibióticos ampicilina y oxitetraciclina (Mazón-Suástegui *et al.*, 2017). Los resultados mostraron un incremento en la actividad de la enzima superóxido dismutasa y mayor supervivencia (85%) en organismos retados con un patógeno (*Vibrio alginolyticus*) cuando fueron previamente tratados con el CBAD *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> (PaV Mix/PhA 30C), mientras que en los juveniles tratados con el antibiótico ampicilina y oxitetraciclina registraron la menor supervivencia (53% y 30% respectivamente) y menor actividad SOD. Los organismos pertenecientes al control negativo (sin tratamiento) presentaron una supervivencia del 0% (Mazón-Suástegui *et al.*, 2017). En otro estudio realizado con juveniles de *Seriola rivoliana* el uso profiláctico de CBADs formulados a partir de cepas patógenas de *V. paraheamolyticus* + *V. alginolyticus* permitió incrementar la expresión de los genes IL-1 $\beta$  y MyD88, cuando los organismos fueron retados contra *V. paraheamolyticus* (Mazón-Suástegui *et al.*, 2019a).

Los resultados experimentales obtenidos en los estudios anteriores han permitido establecer que los CBADs, tienen la capacidad de producir efectos biológicos cuantificables en los organismos marinos tratados, y que sus efectos se encuentran íntimamente ligados a la conservación de la homeostasis y a un incremento en su respuesta inmune. En el caso de la almeja Catarina *A. ventricosus*, se ha sugerido que dentro del área de la “homeopatía acuícola” los CBADs son una alternativa viable para la sustitución o disminución del uso de antibióticos y de otros agentes quimioterapéuticos de amplia utilización en la acuicultura intensiva (Mazón-Suástegui *et al.*, 2017).

Derivado de lo anterior, existe un gran interés en la evaluación detallada del efecto de CBADs comerciales como *Silicea terra*<sup>®</sup> *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> y VidatoX<sup>®</sup>, registrados como medicamentos homeopáticos autorizados para uso humano, en moluscos bivalvos de importancia comercial. Igualmente, existe interés en estudiar los efectos derivados de la aplicación de otros CBADs desarrollados en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIB<sup>®</sup>), a partir de Metasilicato de sodio, Ácido fosfórico, y nosodes de *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio parahaemolyticus*, debido a que tienen potencial para incrementar crecimiento y supervivencia, activando además la respuesta inmune en moluscos, camarón y peces marinos (Mazón-Suástegui *et al.*, 2017, 2018b).

#### **2.4 Transcriptómica: una herramienta para entender la acción de los CBADs en la almeja Catarina *A. ventricosus***

Los efectos que generan los compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) sobre los organismos son diversos y dependen del producto o tratamiento aplicado. Hasta ahora los resultados experimentales sugieren que los CBADs formulados a partir de sílice, ácido fosfórico, cepas patógenas de *Vibrio* (CIB<sup>®</sup>), y VidatoX<sup>®</sup>, pueden generar una respuesta inmunomoduladora en organismos marinos (Mazón-Suástegui *et al.*, 2017; Ortiz-Cornejo *et al.*, 2017). Sin embargo, aún no se conocen los procesos biológicos, rutas metabólicas o vías de señalización reguladas por efecto de CBADs en organismos marinos, que permiten desencadenar los procesos detectados a nivel fisiológico, como el incremento en la actividad antioxidante, sobre regulación de genes asociados a la activación de la respuesta inmune y citoprotección. La aplicación de herramientas analíticas derivadas de las ciencias ómicas, como la transcriptómica (una disciplina joven aun), puede facilitar su estudio y permitir entender la respuesta molecular que se lleva a cabo por determinada condición.

Actualmente la tecnología RNA-Seq permite realizar análisis transcriptómicos con una mayor perspectiva y resolución, comparado con los métodos basados en microarreglos y secuenciación por Sanger (Nagalakshmi *et al.*, 2010; Li y Li, 2014). El uso de la tecnología RNA-Seq revolucionó la manera en que los transcriptomas de eucariotas son analizados (Wang *et al.*, 2009), ya que permite caracterizar todo el transcriptoma y hace

posible observar genes expresados diferencialmente, al igual que sus isoformas (Richard *et al.*, 2017). Esta tecnología está basada en la generación de millones de lecturas cortas que representan fragmentos de RNA, y permite visualizar el RNA total (RNAs codificantes y no codificantes) presente en una muestra biológica. La técnica RNA-Seq ha sido ampliamente utilizada en el estudio de la inmunología de moluscos, lo que ha generado avances que no hubieran sido posibles sin la reciente aplicación de las ciencias ómicas, que permiten descubrir genes, marcadores y rutas asociadas en diversos procesos biológicos (Gómez-Chiarri *et al.*, 2015a; 2015b). El uso de la transcriptómica en acuicultura tiene aplicaciones diversas, incluyendo la selección de reproductores, conservación de recursos, determinación del estrés fisiológico, efectos de la toxicología, desarrollo biológico, resistencia a enfermedades e inmunología en especies de interés acuícola comercial (Li y Li, 2014; Zhao *et al.*, 2017).

La tecnología RNA-Seq y el análisis bioinformático de transcriptomas, han demostrado ser de gran ayuda para comprender las complejas relaciones existentes entre enfermedades, medicamentos y organismos (Sá *et al.*, 2017), y han permitido entender la interacción farmacodinámica medicamento-individuo (Richard *et al.*, 2017) y la visualización de rutas de transducción de señales (Benjamin *et al.*, 2005; Li y Li, 2014). Adicionalmente, han facilitado entender el significado biológico de los cambios inducidos y de los mecanismos de regulación activados mediante la sub- o sobre-expresión de genes por efecto de la aplicación de diversos medicamentos (Davidson *et al.*, 2002).

El análisis transcriptómico es una herramienta de gran interés para el estudio del modo de acción de los CBADs, ya que ciertos autores han observado cambios en la modulación de la expresión de genes, posterior al tratamiento homeopático aplicado (de Oliveira *et al.*, 2008; Saha *et al.*, 2013; Bellavite *et al.*, 2014b).

### 3. JUSTIFICACIÓN

La almeja Catarina (*A. ventricosus*) es una especie nativa de Baja California Sur, México, con importancia comercial, cuyo cultivo no se ha podido mantener debido principalmente a un desabasto de juveniles (“semillas”) producidos en laboratorio. Una de las principales causas es la presencia de patógenos en el agua, que en condiciones propicias, pueden generar una patología o enfermedad específica.

La presencia de bacterias patógenas en el agua de cultivo se ha tratado de mitigar con el uso de antibióticos; sin embargo, estos productos quimioterapéuticos han demostrado generar efectos adversos en la salud de los organismos y fomentan la generación de nuevas cepas multi-resistentes a los antibióticos. Esta situación lleva a buscar y evaluar alternativas más eficientes y eco-amigables, como lo son los CBADs, que han demostrado fortalecer el sistema inmune en animales, incluyendo a los invertebrados marinos y particularmente a la especie objetivo de esta investigación: la almeja Catarina *A. ventricosus*. Sin embargo aún se desconoce el modo de acción de los CBADs en los sistemas de los organismos marinos.

Por lo anteriormente expuesto, se pretende evaluar y entender la acción específica de los CBADs en la respuesta inmune de juveniles de almeja Catarina *A. ventricosus*. Se utilizarán dos CBADs con registro en la Secretaría de Salud de México como medicamentos homeopáticos para uso humano (*Silicea terra*<sup>®</sup> + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> y VidatoX<sup>®</sup>), que han demostrado activar la respuesta inmune en organismos marinos retados ante patógeno, y tres CBADs formulados en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIB<sup>®</sup>), uno a base metasilicato de sodio + ácido fosfórico, y dos nosodes formulados a partir de patógenos que causan mortalidades masivas en moluscos bivalvos. Estos CBAD fueron seleccionados con base al principio de hormesis (principio de la *similia*), donde la respuesta biológica se caracteriza por una acción benéfica a dosis bajas y efectos nocivos a dosis altas (acción bifásica).

La presente investigación pretende contribuir a cerrar la brecha de conocimiento que existe con relación a la forma de acción de los CBADs aplicados como agentes estimulantes de los mecanismos propios de defensa en juveniles de *A. ventricosus*, mediante la evaluación a nivel fisiológico y transcriptómico de los organismos tratados.

#### 4. HIPÓTESIS

La aplicación de compuestos bioactivos altamente diluidos con potencial inmunomodulador en organismos marinos y formulados a partir de cepas patogénicas de *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio parahaemolyticus*, metasilicatos de sodio, ácido fosfórico, *Silicea terra*<sup>®</sup>, *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> y VidatoX<sup>®</sup>, tendrá un efecto modulador de los procesos biológicos asociados a la respuesta inmune de la almeja Catarina *Argopecten ventricosus*, y ésta será cuantificable a nivel fisiológico y transcriptómico.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Evaluar la acción de compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) en juveniles de almeja Catarina (*Argopecten ventricosus*, Sowerby II, 1842) en condiciones de laboratorio.

### 5.2 Objetivos Particulares

- Evaluar el efecto de CBADs, sobre el estado fisiológico inmune en juveniles de almeja Catarina (*Argopecten ventricosus*) en condiciones de laboratorio.
- Evaluar el efecto de CBADs, sobre la condición fisiológica general en juveniles de almeja Catarina (*Argopecten ventricosus*) en condiciones de laboratorio.
- Evaluar el efecto de CBADs, en el perfil transcriptómico de juveniles de almeja Catarina (*Argopecten ventricosus*) en condiciones de laboratorio, utilizando la tecnología RNA-Seq.
- Evaluar el efecto de CBADs sobre la expresión diferencial de genes blanco seleccionados del objetivo 3, en branquia, manto y glándula digestiva de juveniles de almeja Catarina (*Argopecten ventricosus*) en condiciones de laboratorio, utilizando la técnica de RT-qPCR.

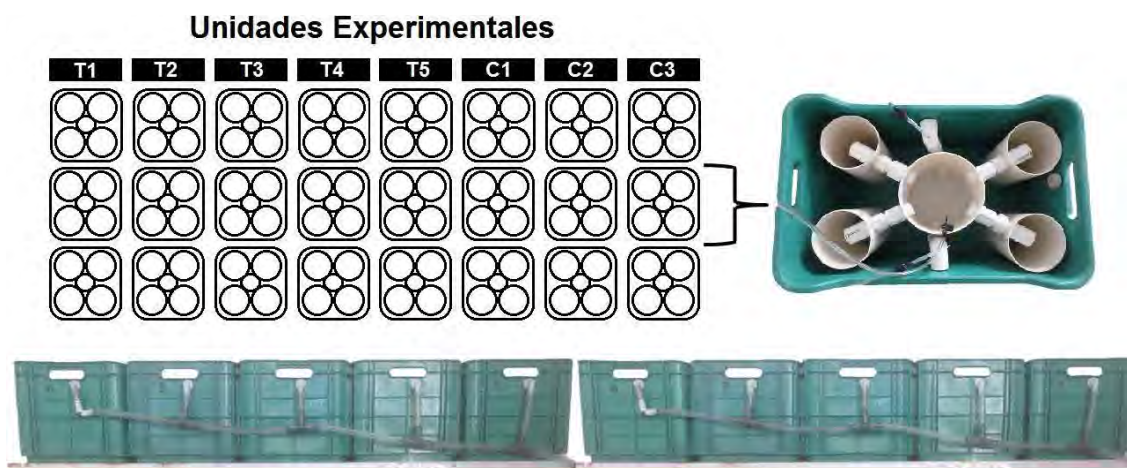
## 6. MATERIALES Y METODOS

### 6.1 Obtención y aclimatación de los organismos

Se obtuvieron de la asociación no gubernamental Noroeste Sustentable A.C. (NOS), 1,500 juveniles de almeja Catarina *A. ventricosus* de 3 meses de edad, con altura promedio de  $1.98 \pm 0.1$  cm y un peso de  $1.5 \pm 0.14$  gr, producidos en el laboratorio comercial de Acuicultura Robles S.P.R. de R.I.

Los organismos fueron colectados en la granja de cultivo de NOS, en bahía de La Paz B.C.S., durante el mes de marzo del año 2016 y se transportaron en bolsas de malla plástica humedecida dentro de una hielera. Los organismos fueron recibidos en el Laboratorio de Homeopatía Acuícola y Semillas Marinas del Programa de Acuicultura del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., en La Paz, B.C.S. (PAC-CIBNOR). Después de realizar una limpieza general de los organismos para descartar epibiontes, se traspasaron a una unidad de preengorda con capacidad de 1,500 L. Los juveniles se mantuvieron con flujo ascendente re-circulante durante una semana, a temperatura de 24°C, con agua de mar filtrada (1  $\mu$ m, luz UV y carbón activado), con aireación constante y salinidad de 37-38 UPS.

Durante su aclimatación, los organismos fueron alimentados con una mezcla de microalgas cultivadas (*Isochrysis galbana* y *Chaetoceros calcitrans* en proporción celular 1:1), manteniendo en la unidad experimental una concentración de 150,000 cel mL<sup>-1</sup>. Al concluir el proceso de aclimatación, los organismos se colocaron en unidades experimentales de preengorda de material plástico denominadas “minisurgencias”, constituidas por un contenedor (tara) plástico (36 L) y cuatro cilindros de surgencia de tubo PVCS 4”. Estos cilindros fueron operados con flujo ascendente re-circulante, mediante un sistema de flujo por aerosifón conectado a un tubo colector central de PVCS 8”. En total se dispuso de 24 unidades experimentales, cada una con 4 cilindros de surgencia, sumando un total de 96 cilindros. En cada cilindro se colocaron 13 almejas juveniles (semillas), haciendo un total de 52 organismos por unidad experimental o minisurgencia y un total de 1,248 semillas en el experimento (Fig. 4).



**Figura 4.** Unidades experimentales de mini-surgencia utilizadas para evaluar el efecto de compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) en juveniles de almeja Catarina *Argopecten ventricosus*.

## 6.2 Cultivo de microalgas

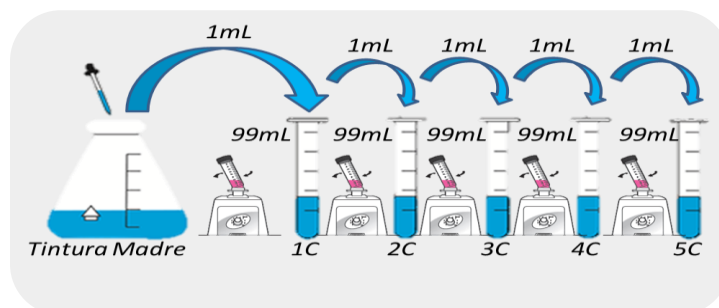
La producción de microalgas se llevó a cabo en tanques cilíndricos transparentes de policarbonato, con capacidad de 1,700 L, con volumen operativo de 1,500 L. Para cada especie de microalga, todos los días se inocularon 40 L de microalga en 1,000 L de agua de mar filtrada a 1  $\mu\text{m}$ , pasada por luz UV y carbón activado enriquecida con medio f/2, adicionando silicatos para el caso del cultivo de la diatomea *C. calcitrans*. Los inóculos de microalga fueron proporcionados por el Laboratorio de Producción de Alimento Vivo del CIBNOR y su producción fue escalada en bolsas de plástico de 40L litros, que posteriormente se utilizaron como inóculos para producción masiva en las columnas de policarbonato (1,500 L).

## 6.3 Preparación de los compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs)

Los tratamientos T1 (*Vibrio parahaemolyticus* 1D + *Vibrio alginolyticus* 1D) y T2 (*Vibrio parahaemolyticus* 7C + *Vibrio alginolyticus* 7C), se formularon en CIBNOR a partir de una tintura madre preparada con biomasa inactivada de cepas patógenas (lisados bacterianos) de *Vibrio parahaemolyticus* (CAIM 170; [www.ciad.mx/caim](http://www.ciad.mx/caim)) y *Vibrio alginolyticus* (CAIM 57 [www.ciad.mx/caim](http://www.ciad.mx/caim)) aisladas de procesos de mortalidad masiva.



Para el caso específico de cada cepa, se preparó un concentrado inicial o tintura madre (TM) en un laboratorio certificado de microbiología en CIBNOR, a partir de 15 mL de biomasa húmeda obtenidos por centrifugación (3,300 g, 4°C, 20 min) de 2 L de cultivo de cada cepa de *Vibrio* ( $105 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>) cultivada en medio líquido 2216 (BD Difco™, USA). Para cada cepa, el pellet de biomasa húmeda fue macerado, homogenizado y completamente inactivado por tres ciclos de congelamiento-descongelamiento a -80°C y 24°C, a fin de romper la pared celular y liberar los principios activos de cada cepa. Entre cada ciclo de congelamiento-descongelamiento se llevó a cabo un proceso de agitación por dos minutos a 3,200 rpm en equipo vortex (Benchmark mixer™, Benchmark Scientific Inc.). El producto inactivado resultante fue nuevamente llevado a su volumen original (2L) utilizando etanol 87% para uso en homeopatía (Similia®; Farmacia Homeopática Nacional®, CDMX, México) y se agitó durante dos minutos a 3200 rpm en equipo vortex (Benchmark mixer™, Benchmark Scientific Inc.). El resultado final de este proceso fue la obtención de un concentrado inicial o tintura madre (TM), a partir del cual se aplicó la técnica homeopática de dilución serial y agitación o sucusión (Dinamización homeopática). A partir del concentrado (TM) se obtuvieron las dinamizaciones decimales (1:10) o centesimales (1:100) correspondientes, de acuerdo a lo establecido por los principios homeopáticos (Bellavite y Signorini 2002) descritos en la figura 5. Como resultado se obtuvieron diluciones de trabajo decimales 1D ( $1 \times 10^{-1}$ ) o centesimales 7C ( $1 \times 10^{-14}$ ). La última dilución se realizó con agua destilada para minimizar potenciales efectos producidos por el etanol (López-Carvallo *et al.*, 2019, 2020).



**Figura 5.** Proceso aplicado para formular los tratamientos experimentales basados en compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs). Se explica el proceso de dinamización centesimal (dilución serial 1:100 y sucusión) que implica diluciones

centesimales sucesivas. 1C: dilución  $1 \times 10^{-2}$ ; 2C: dilución  $1 \times 10^{-4}$ ; 3C: dilución  $1 \times 10^{-6}$ ; 4C: dilución  $1 \times 10^{-8}$  y 5C: dilución  $1 \times 10^{-10}$ .

El tratamiento T3 (Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D) se formuló en CIBNOR a partir de tinturas madre (TMs) de metasilicato de sodio y ácido fosfórico. Para ello se consideraron TMs al ácido fosfórico grado analítico al 86% (Faga Lab<sup>®</sup>, Guamuchil, México) y a una solución saturada de metasilicato de sodio. Esta solución saturada o TM de metasilicato de sodio, se preparó mediante la dilución de 9.4 gr del compuesto en agua destilada a temperatura ambiente (25°C) hasta que se alcanzó un punto de saturación. Ambos concentrados o TMs de ácido fosfórico y de metasilicato de sodio, fueron diluidos (1:10) en agua destilada y agitados (3200 rpm, 2min; equipo vortex ya descrito), por separado para obtener soluciones de trabajo 1D, es decir, los tratamientos experimentales aplicados.

Los CBADs del tratamiento T4 (*Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C) y T5 (VidatoX<sup>®</sup> 31C) se elaboraron a partir de medicamentos homeopáticos comerciales. El tratamiento T4 consistió en una dilución centesimal (1:100 dilución/agitación) preparada a partir de los medicamentos de uso humano *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 6C y *Silicea terra*<sup>®</sup> 6C, ambos de Laboratorios Similia<sup>®</sup>. El tratamiento T5 (ViT 31C) se elaboró mediante una dilución centesimal (1:100 dilución/agitación) del medicamento homeopático VidatoX<sup>®</sup> 30CH del Laboratorio Labiofam<sup>®</sup>, de origen cubano y formulado a partir de veneno del escorpión *Rhopalurus junceus*. Como se mencionó anteriormente, para minimizar potenciales efectos nocivos y colaterales asociados al etanol, el excipiente o vehículo de dilución utilizado en la última dinamización (dilución-sucusión) de los tratamientos experimentales, fue agua destilada.

#### 6.4 Diseño experimental

Se evaluó el efecto de cinco compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) en dinamización decimal (D) o centesimal (C) durante 21 días. Cuatro de estos tratamientos se administraron en forma de complejos (T1 a T4) y uno en forma individual (T5): T1 (*Vibrio parahaemolyticus* 1D + *Vibrio alginolyticus* 1D), T2 (*Vibrio parahaemolyticus* 7C + *Vibrio alginolyticus* 7C), T3 (Metasilicato de sodio 1D + Ácido

fosfórico 1D), T4 (*Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C) y T5 (VidatoX<sup>®</sup> 31C). En el diseño experimental se incluyeron también tres controles: (C1) Etanol 87°G dinamizado 1C; (C2) Etanol 87°G diluido 1:100, y (C3) Agua destilada. Esto suma un total de 8 grupos experimentales incluyendo tratamientos y controles; todos se aplicaron por triplicado, de manera que para cada tratamiento (CBAD o control), se dispuso de tres unidades experimentales, c/u con cuatro minisurgencias.

Durante el experimento las unidades experimentales se mantuvieron a temperatura de  $23.5 \pm 0.5$  °C, con flujo continuo de agua de mar filtrada a 1  $\mu$ M, pasada por luz UV y carbón activado, a salinidad de 37 UPS y con aireación constante. El agua de mar y el alimento se suministraron en conjunto, estableciendo un flujo de  $1.68 \text{ mL s}^{-1}$  durante 21 horas al día. Este flujo se suspendió durante la limpieza diaria de rutina en reservorios destinados al almacenamiento de agua y alimento y en las unidades experimentales, retirando mediante sifoneo los desechos depositados en el fondo.

Los tratamientos se aplicaron diariamente en las unidades experimentales una vez concluida la rutina de limpieza. Durante la aplicación de los tratamientos experimentales, se suspendió el flujo de agua (entrada-descarga) de las unidades y se mantuvo el flujo recirculante interno de los cilindros de surgencia inducido por aerosifón. Los tratamientos complejos (tratamientos con 2 diluciones formuladas con CBADs) se aplicaron en días alternados. Se adicionaron 100 $\mu$ L del tratamiento (CBAD o Control), por cada litro de agua, una dosis probada con anterioridad y con resultados positivos en la inmunomodulación de juveniles de almeja Catarina *A. ventricosus* (Mazón-Suástegui *et al.*, 2017). Para favorecer la captación por parte de los moluscos, del tratamiento añadido en el agua de cultivo, el flujo de agua entrada-descarga se interrumpió durante tres horas, sabiendo que son capaces de filtrar la totalidad del volumen de agua en ese tiempo. Se ha reportado que en condiciones normales (20°C, salinidad 36 ups), los juveniles de *A. ventricosus* pueden filtrar  $10 \text{ L h}^{-1} \text{ gr}^{-1}$  de peso seco (Sobrino-Figueroa y Cáceres-Martínez, 2014).

Todos los grupos experimentales fueron alimentados con una ración microalgal diaria de  $199,607,794 \text{ células organismo}^{-1} \text{ día}^{-1}$ , equivalente al 10.8% del peso seco de los organismos y basada en una dieta base compuesta por una mezcla de las microalgas *I. galbana* – *C. calcitrans* en proporción celular 1:1.

Los organismos se mantuvieron en tratamiento durante 21 días y se realizaron 2 muestreos, uno inicial al día 0 y uno final al día 21. Al inicio (día 0) y final (21) del experimento, se fijaron muestras en RNAlater para análisis de expresión diferencial de genes (RNA-Seq, RT-qPCR), y en ultracongelación (-80°) para llevar a cabo análisis enzimáticos y de reservas energéticas. Igualmente, se fijaron y preservaron muestras de tejidos en solución Davidson para su análisis histológico posterior. Se realizaron biometrías semanales para la determinación de supervivencia y registro de incrementos en longitud y peso de los organismos.

### **6.5 Conteo de hemocitos**

El conteo de hemocitos se llevó a cabo siguiendo la metodología de Bianchi *et al.*, (2015), a fin de detectar y evaluar el reconocimiento de los CBADs y el grado de activación del sistema inmune en diversos tejidos diana de juveniles de *A. ventricosus*. Para contar el número de hemocitos contenido en una determinada área de tejido (0.21 mm<sup>2</sup>), se seleccionaron tres imágenes fotográficas a 100X por cada organismo. Las imágenes fueron obtenidas de cortes histológicos con tinción hematoxilina-eosina y se procesaron con el programa Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Bethesda, MD).

### **6.6 Actividad Antioxidante**

La actividad antioxidante se determinó utilizando 0.1g de tejido previamente congelado y almacenado a -80°C. Las muestras fueron homogenizadas con un buffer de fosfatos 50mM, pH 7.8 en proporción 1:5, utilizando micro-esferas de vidrio y equipo fastPrep (2 ciclos, 4 m s<sup>-1</sup>, 30 s). Para obtener el extracto enzimático final, se recuperó el sobrenadante de las muestras centrifugadas a 12,000 g (Eppendorf 5810-R, Hamburg, Alemania), a temperatura de 4°C durante 10 min.

El análisis de actividad superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) se llevó a cabo por triplicado para cada muestra y se midió con la finalidad de entender el efecto de CBADs en el sistema antioxidante de los juveniles de almeja Catarina. La actividad

SOD se determinó mediante el uso del kit SOD Sigma-Aldrich #19160, el cual mide el porcentaje de la sal de tetrazolio soluble en agua (WST-1) en la inhibición del complejo formazan. El contenido de proteínas contenido en el extracto fue cuantificado utilizando el reactivo Bradford (Sigma-Adrich #B6916) para expresar la actividad SOD como unidades  $\text{mg proteína}^{-1}$ . La actividad CAT se determinó por el método de Clairborne (1985), en el cual la descomposición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  es determinada. Lo anterior, entendiéndose que una unidad de actividad enzimática es definida como la cantidad de enzima requerida para degradar  $1\text{mmol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $1\text{ min}$ .

## 6.7 Histología

Los organismos desconchados y previamente fijados en solución Davidson durante 48hrs, se deshidrataron en una serie de alcoholes en concentración ascendente (etanol al  $70^\circ$ ,  $80^\circ$ ,  $95^\circ$  y  $100^\circ$ ), para posteriormente ser pasados a xileno, ser incluidos en parafina, cortados a un grosor de  $4\ \mu\text{m}$ , montados en laminillas de vidrio y teñidos con hematoxilina-eosina (HE), siguiendo la metodología de Kim *et al.*, (2006).

### 6.7.1 Índice de músculo liso, músculo estriado y glándula digestiva

A partir de microfotografías de tejidos con tinción HE, se procesaron tres imágenes a 20X de cada organismo, tomadas aleatoriamente de tres tejidos distintos (músculo liso, músculo estriado, glándula digestiva), con el programa Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Bethesda, MD). La información fue utilizada para determinar la condición fisiológica general de los organismos utilizando el índice de músculo liso (IML), índice de músculo estriado (IME) e índice de glándula digestiva (IGD), como fue descrito por Mazón-Suástegui *et al.*, (2009). El IGD fue calculado aplicando la siguiente fórmula:

$$IGD \% = \frac{\mathcal{I}_{AA} (\mu\text{m}^2)}{\mathcal{I}_{CA} (\mu\text{m}^2)} * 100 \dots \dots \dots (1)$$

Donde CAA es el área de cobertura ocupada por los adenómeros del individuo y TCA es el área de cobertura total de la imagen.

Los índices musculares (IML, IME) se determinaron de acuerdo con las siguientes formulas:

$$IML \% = \frac{CAIM (\mu m^2)}{TCA (\mu m^2)} * 100 \dots\dots\dots(2)$$

$$IME \% = \frac{CAIM (\mu m^2)}{TCA (\mu m^2)} * 100 \dots\dots\dots(3)$$

Donde CAIM es el área de cobertura de los paquetes de las fibras musculares y TCA es el área de cobertura total de la imagen.

## 6.8 Reservas energéticas

La composición bioquímica de los tejidos para cada muestra se llevó a cabo por triplicado. Las muestras previamente congeladas y almacenadas -80°C se liofilizaron (VirtTis, BenchTop 3.5, NY, USA) durante 24 h. Posteriormente se re-hidrataron en 1 mL de agua destilada y se homogenizaron para obtener los extractos crudos. Estos extractos se utilizaron directamente para evaluar el contenido de lípidos, carbohidratos y proteínas en las muestras correspondientes a los diferentes tratamientos y controles experimentales.

### 6.8.1 Carbohidratos totales

Para determinar la concentración de carbohidratos presente en los tejidos se utilizó un método basado en Roe *et al.* (1961), el cual se describe a continuación. Se tomó una

alícuota de 100  $\mu\text{L}$  del homogenizado de la muestra, adicionando 100  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético para después centrifugar (Eppendorf 5810 R, NY-USA) a 1500 g durante 10 minutos a 5°C. Enseguida se tomó una alícuota de 25  $\mu\text{L}$  del sobrenadante para la determinación carbohidratos. Al sobrenadante se adicionaron 250  $\mu\text{L}$  de antrona diluida en ácido sulfúrico al 96% calentando a 85°C durante 10 min. Posteriormente las muestras se pasaron a un baño de hielo para ser enfriadas y se recuperaron 200  $\mu\text{L}$  en una microplaca para tomar una lectura a una absorbancia de 630 nanómetros.

### **6.8.2 Proteínas totales**

Para el análisis de proteínas totales se utilizó el protocolo del ácido biciconínico (BCA) establecido por el laboratorio de Bioquímica Fisiológica del CIBNOR siguiendo el método de Smith *et al.* (1985). Se tomó una muestra de 10  $\mu\text{L}$  del homogenizado y se le añadieron 500  $\mu\text{L}$  de hidróxido de sodio para llevar a cabo la digestión de proteínas, dejando reposar durante dos horas. Enseguida, las muestras se sembraron en microplaca y se agregaron 200  $\mu\text{L}$  del reactivo BCA, dejando incubar durante 15 minutos a 60°C hasta lograr una tinción de color morado antes de proceder a su lectura en un espectrofotómetro (Thermo Scientific, Multiskan Spectrum, Finland) a 562 nanómetros. Se utilizó un estándar de albumina de bovino, como control de referencia en una curva de calibración.

### **6.8.3 Lípidos totales**

El contenido de lípidos totales se determinó con el método de sulfo-fosfo vainillina según Barnes y Blackstock (1973). Se tomaron 25  $\mu\text{L}$  del homogenizado, se agregaron 250 $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico concentrado y se dejó reposar por 10 minutos en baño maría a 90°C. Enseguida se procedió a enfriar en baño de hielo, se sembraron 20 $\mu\text{L}$  de la alícuota en una microplaca y se adicionaron 200 $\mu\text{L}$  de vainillina. Las muestras se incubaron durante 40 minutos y se tomó la lectura a una absorbancia de 540 nm.

## 6.9 Crecimiento y supervivencia

El crecimiento y supervivencia de las almejas durante el experimento fue evaluado semanalmente durante tres semanas (21 días). La supervivencia fue determinada mediante la identificación diaria de organismos vivos y muertos, removiendo en su caso estos últimos de las unidades experimentales para evitar problemas en la calidad de agua. El crecimiento en peso se registró mediante la toma de una muestra de cada unidad experimental, registrando el peso húmedo en vivo de cada organismo (carne y concha), con ayuda de una báscula digital (Scout Pro, OHAUS, Shanghai, China). De cada almeja pesada se tomaron imágenes digitales con el fin de medir posteriormente la altura de la concha de los organismos utilizando el programa Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Bethesda, MD) (Fig. 6).



**Figura 6.** Altura de la concha en juveniles de almeja Catarina *Argopecten ventricosus*.

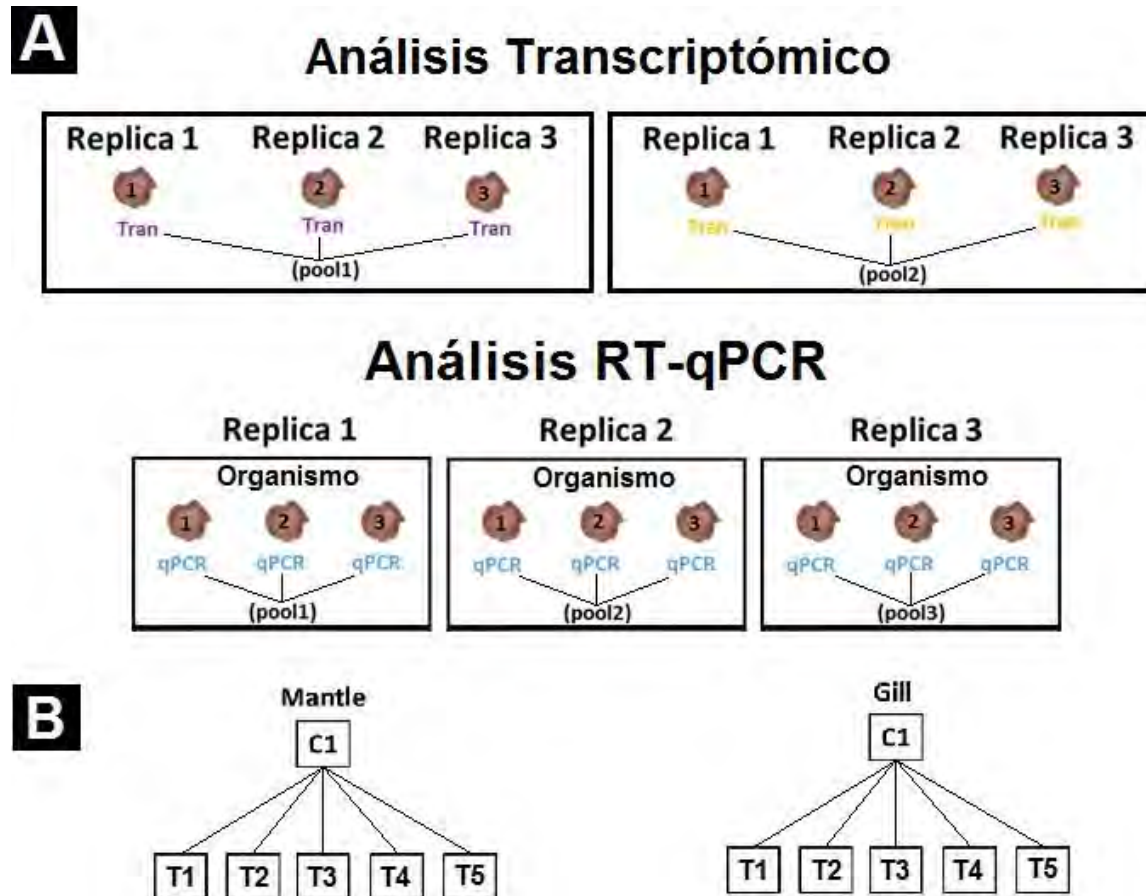
## 6.10 Extracción de RNA y síntesis de cDNA

Para el análisis transcriptómico utilizando tecnología RNA-Seq, se realizó un “pool” de ~100 mg de cada tejido evaluado (manto y branquia), utilizando tres almejas por tratamiento (Fig. 7A) fijadas previamente en solución RNAlater (RNAlater Stabilization solution #AM7020, ThermoFisher, Scientific, MA, USA).

En total se obtuvieron 2 “pools” para cada tratamiento (Fig. 7A) y cada “pool” se consideró como una réplica biológica. Manto y branquia se eligieron como tejidos blanco por estar ampliamente ligados a la respuesta inmune en moluscos bivalvos



(Bachère *et al.*, 2015; Gerdol, 2017). Para el análisis de RT-qPCR se obtuvieron 3 “pools” (~100 mg) por tejido (glándula digestiva, manto y branquia) para cada tratamiento (Fig. 7A). La glándula digestiva se integró en el análisis de RT-qPCR ya que este tejido también se encuentra relacionado con la respuesta inmune en moluscos bivalvos.



**Figura 7.** A) Diagrama del muestreo y logística que muestra la estrategia para realizar replicas biológicas de juveniles de almeja Catarina *Argopecten ventricosus* tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs), para llevar a cabo el análisis del perfil transcriptómico utilizando tecnología RNA-Seq y el análisis de expresión relativa por RT-qPCR. Cada diagrama muestra la agrupación que se realizó para cada tejido (manto y branquia) por condición experimental; B) Estrategia para evaluar expresión diferencial de genes en el análisis transcriptómico utilizando tecnología RNA-Seq. En ambos tejidos (manto y branquia) cada tratamiento fue comparado contra el control C1. T1: *V. parahaemolyticus* 1D + *V. alginolyticus* 1D, T2: *V. parahaemolyticus* 7C + *V. alginolyticus* 7C, T3: Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D, T4: *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C, T5: VidatoX<sup>®</sup> 31C, C1: Etanol 1C.

La extracción de RNA total de todas las muestras se llevó a cabo siguiendo la metodología de Morelos *et al.*, (2015). La muestra previamente fijada en RNAlater<sup>®</sup> (~100mg) se enjuagó con agua destilada y se fijó en Tripure Isolation Reagent (ROCHE: 40% de fenol, 24% de guanidina y tiocinato, IN, USA). Una vez que las muestras se fijaron, se adicionaron micro esferas de vidrio estériles (100 mg de esferas de vidrio con diámetro de 300  $\mu\text{m}$  y una esfera con diámetro de 1500  $\mu\text{m}$ ), y se llevó a cabo una ruptura de los tejidos para la liberación de RNA, con ayuda de un equipo FastPrep-24 (MP Biomedicals, LLC, Santa Ana, CA, USA) (2 ciclos de 25 min a 4 m s<sup>-1</sup>), seguido de un proceso de centrifugación (15,000 g, 10 min, 4°C) para recuperar el sobrenadante. La fase acuosa recuperada del sobrenadante se purificó con etanol-cloroformo seguido de una limpieza con cloruro de litio (Sambrook *et al.*, 2006). La calidad e integridad del RNA se evaluó por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1 % utilizando buffer TBE 1X y el contenido de RNA total se cuantificó con equipo de espectrofotometría NanoDrop 2000/2000c<sup>™</sup> (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). La contaminación potencial por DNA fue eliminada utilizando un protocolo de limpieza con DNAsa (Morelos *et al.*, 2015), en el cual se aplica una unidad de DNAsa por cada mg de RNA. La no amplificación de DNA se corroboró mediante PCR, utilizando el gen 18S ribosomal e incluyendo un control positivo y uno negativo. La reacción para comprobar la no amplificación se llevó a cabo en 6  $\mu\text{L}$ , los cuales incluyeron 1  $\mu\text{L}$  de la extracción de RNA y 5  $\mu\text{L}$  de mix (0.25 U/ $\mu\text{L}$  de DNA polimerasa GoTaq Flexi (Promega, Madison, WI, USA), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1X Buffer GoTaq Flexi, 0.2 mM dNTP's Mix, 0.28  $\mu\text{M}$  de primers). Los parámetros de amplificación incluyeron 4 min a 95°C, seguidos de 36 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 60°C y 30 s a 72°C, y al término de estos ciclos se agregó una curva de disociación (10 min a 72°C). El RNA libre de DNA fue nuevamente evaluado en integridad y concentración, de acuerdo al protocolo descrito anteriormente. Se corroboró la calidad y concentración del RNA de las respectivas extracciones seleccionadas para el análisis transcriptómico, y las muestras (32 "pools", 2 por tratamiento por tejido), se enviaron para su secuenciación, al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO, Laboratorio de Servicios Genómicos, CINVESTAV, Campus Irapuato, GTO, MX).

La síntesis de cDNA se realizó en las muestras de RNA seleccionadas para la evaluación de expresión de genes por RT-qPCR, siguiendo la metodología de Morelos *et al.*, 2015 utilizada para la cuantificación de la expresión relativa en el pectínido *Nodipecten subnodosus*. De acuerdo con esta técnica, se llevó a cabo una reacción con 2µg de RNA, Buffer Improm Promega® (5X), MgCl Promega® (25µM), dNTP's (10mM), RNAsin Promega® (40 u µL<sup>-1</sup>) y la enzima transcriptasa reversa Improm II Promega® (160 u µL<sup>-1</sup>) en una reacción final de 40 µL. Los parámetros para la síntesis de cDNA fueron: 5 min a 25°C, 60 min a 42°C, 15 min a 70°C y 10 min a 10°C. La síntesis de cDNA fue corroborada por PCR utilizando la amplificación del gen ribosomal 18S, utilizando las condiciones de PCR previamente mencionadas.

## **6.11 Análisis transcriptómico (RNA-Seq)**

### **6.11.1 Secuenciación Illumina**

Los 32 “pools” de RNA obtenidos, se colocaron en una hielera sellada con hielo seco y bolsas de gel congeladas y se enviaron para su análisis al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO), en donde se evaluó la integridad del RNA total con el equipo BioAnalyzer 2100 (San Diego, CA, USA), para verificar la calidad de las muestras antes de realizar la secuenciación masiva. Los estándares de calidad considerados fueron: 4 µg de RNA total (a concentración de al menos 50 ng mL<sup>-1</sup>) y un RIN por arriba de 7. Una vez que se comprobaron dichos estándares, LANGEBIO procedió a secuenciar usando la plataforma Nextseq500 Sequencing System, illumina (San Diego, CA, USA). En total se prepararon y secuenciaron 32 librerías en una corrida con formato 2X150 de alto rendimiento, mismo que involucra lecturas pareadas con un tamaño de 150 pb. Las lecturas crudas fueron reportadas en NCBI bajo el nombre de acceso PRJNA596225.

### **6.11.2 Ensamble *de novo* y anotación del transcriptoma**

La calidad del total de lecturas (reads) obtenidas de la secuenciación de las 32 librerías de RNA-Seq fueron analizadas usando FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). Posteriormente las lecturas crudas fueron filtradas

con el programa Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014), el cual permite la remoción de adaptadores, lecturas de baja calidad ( $Q < 25$ ), lecturas ambiguas (“N”) y lecturas menores a 50 pb. Solo se retuvieron lecturas de alta calidad, lo cual se corroboró mediante un segundo análisis utilizando el programa FastQC. Con lo anterior se confirmó que solo lecturas de alta calidad fueron utilizadas para realizar el ensamble del transcriptoma de juveniles de almeja Catarina *A. ventricosus* tratados con CBADs.

Debido a que a la fecha no existe un transcriptoma ni genoma de referencia publicado en las bases de datos para *Argopecten ventricosus*, fue necesario realizar un ensamble *de novo* utilizando la plataforma Trinity (Haas *et al.*, 2013), en la cual se seleccionó la opción de lecturas no normalizadas. Trinity fue desarrollado por Broad Institute y la Hebrew University of Jerusalem; permite la reconstrucción de transcritos, reconoce eventos de “splicing” alternativo y se especializa en el análisis de muestras que no tienen genoma de referencia (Grabherr *et al.*, 2011). En Trinity, básicamente se utilizaron 3 programas: 1) Inchworm: que genera un catálogo de k-meros que se sobrelapan, guarda los k-meros y sus secuencias, toma el k-mero más abundante y parte de él (semilla), extiende el extremo 3’ guiado por cobertura (abundancia), si hay un empate busca k-meros que provean la mayor cobertura acumulativa, se extiende el extremo 5’, genera un borrador de contigs, se repite el proceso partiendo de otra semilla, y para cuando ya no hay más k-meros en el catálogo; 2) Chrysalis: que toma contigs generados por inchworm que no tienen k-meros completos compatibles con sus extremos, explora k-meros para reagrupar contigs generados por inchworm, construye un grafo de Bruijn para cada grupo, el grafo se ramifica en sitios de variación. El resultado es la creación de un grafo para cada gen; 3) Butterfly: que colapsa estructuras no ramificadas del grafo, embebe las lecturas originales dentro del grafo, rastreando el camino de cada lectura y verifica la congruencia de lecturas en pares, emitiendo transcritos ensamblados como resultado. El proceso de ensamble requirió una estación de trabajo con 10 cores y 512 GB RAM. Posterior a que el proceso del ensamble fuera completado, se realizó una evaluación de la calidad e integridad del transcriptoma obtenido utilizando herramientas de trinity.

Las lecturas de alta calidad fueron mapeadas con los transcritos ensamblados utilizando el software RSEM, el cual a su vez utiliza Bowtie2 para llevar a cabo el alineamiento (Li y Dewey, 2011). Una vez mapeadas las lecturas, para cada transcrito

se obtuvo un valor de expresión y estos valores se normalizaron a transcritos por millón (TPM) con el fin de remover transcritos con una expresión baja ( $TPM < 0.01$ ). Los transcritos retenidos se compararon contra la base de datos de proteínas y ácidos nucleicos no redundantes de NCBI utilizando BLAST con un valor de  $e < 1e^{-5}$ . Transcritos con hit a virus, bacterias, hongos o grupos filogenéticamente lejanos fueron removidos del transcriptoma utilizando la herramienta SeqClean (<https://sourceforge.net/projects/seqclean/>). Como último paso para tener un transcriptoma de alta calidad, se eliminaron redundancias en el mismo, utilizando primeramente el programa CD-Hit (Limin *et al.*, 2012) agrupando secuencias con un porcentaje de identidad igual o mayor a 97%, para posteriormente utilizar el programa iAssamblar (Zheng *et al.*, 2011). Como resultado se obtuvo un transcriptoma de trabajo, al cual se le evaluó su integridad y calidad utilizando las herramientas PRINSEQ (Schmieder y Edwards, 2011), TransRate (Smith-Unna *et al.*, 2016) y BUSCO (Waterhouse *et al.*, 2017)

Con el fin de determinar la anotación funcional basada en homología de secuencias, las secuencias ensambladas fueron comparadas contra la bases de datos de nucleótidos no redundantes de NCBI, Swiss-Prot, RefSeq, y proteínas predecidas en genomas de *Crassostrea gigas*, *Crassostrea virginica*, *Mytilus galloprovincialis* y *Mizuhopecten yessoensis*, utilizando BLASTX (valor de  $E < 1e^{-5}$ ). La anotación funcional fue asignada de acuerdo a los hits obtenidos con BLAST. Finalmente, se designó una categorización funcional basada en una comparación contra bases de datos de “Gene Ontology” (GO), “InterPro” y “Kyoto Encyclopedia of Genes (KO) usando el software BLAST2GO (Götz *et al.*, 2008, Conesa *et al.*, 2005). Para visualizar las rutas metabólicas involucradas, se utilizó la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) y la anotación se realizó utilizando el servidor automático de anotación KAAS (Automatic Annotation Server) ([https://www.genome.jp/kaas-bin/kaas\\_main](https://www.genome.jp/kaas-bin/kaas_main)).

### **6.11.3 Expresión diferencial y análisis de enriquecimiento**

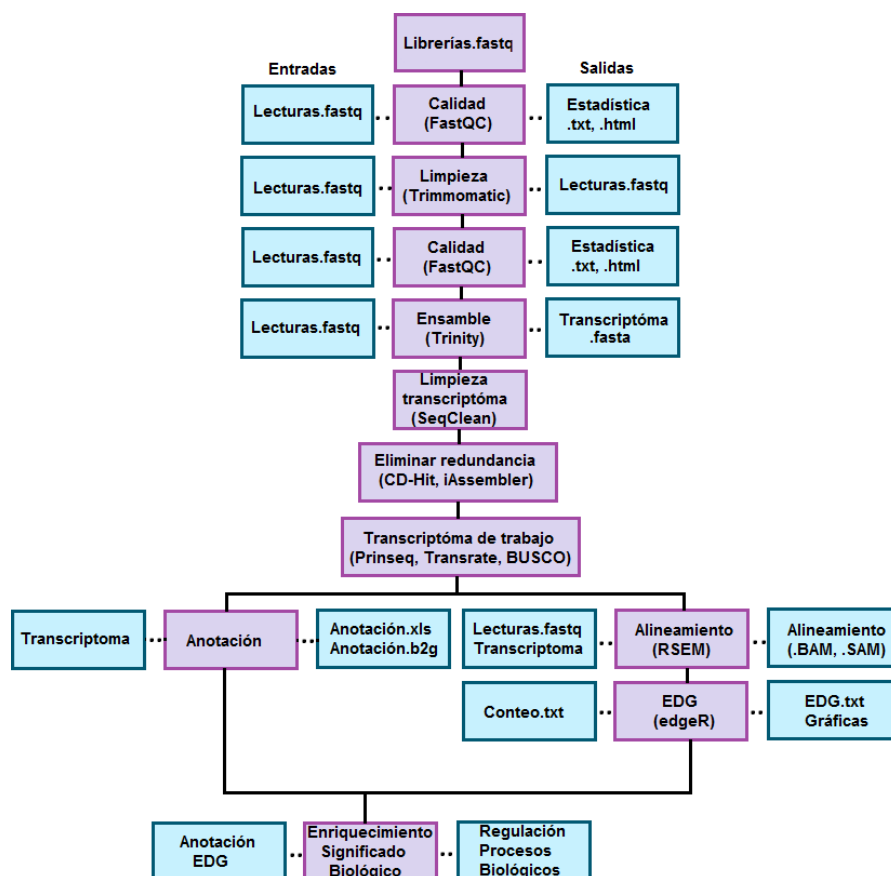
A partir de esta sección y para análisis posteriores, solo se consideraron 28 librerías correspondientes a los tratamientos (CBADs) y al tratamiento control C1, mismo que fue

elegido para ser comparado contra los tratamientos debido a que contenía una proporción de etanol 1:100 y además, fue sometido a sucusión, al igual que los tratamientos basados en CBADs. Lo anterior, asumiendo que de esta manera se obtendría como resultado el efecto asociado directamente al compuesto activo y no posibles efectos generados por el uso de etanol y/o por el proceso de dilución/sucusión (dinamización) de los tratamientos experimentales.

El total de lecturas filtradas fueron alineadas al transcriptoma de trabajo utilizando el software RSEM a fin de obtener un alineamiento de alta calidad y una cuantificación de lecturas por transcrito. El conteo crudo de las lecturas alineadas a cada transcrito se normalizó a fragmentos por millón de kilobases (FPKM por sus siglas en inglés) de lecturas mapeadas (Mortazavi *et al.*, 2008). Para determinar la dispersión entre réplicas biológicas de todos los tratamientos, se determinó el coeficiente de dispersión de Pearson entre todas las librerías experimentales. Solo se trabajaron librerías con una correlación de Pearson  $> 0.88$  entre replicas biológicas. Una librería fue eliminada del análisis debido a que presentó contaminación con secuencias de plantas.

Para continuar con el análisis de expresión diferencial, se consideraron los transcritos que presentaron un nivel de expresión mayor a 0.03 FPKM en ambas replicas biológicas ya que el paquete edgeR de bioconductor tiene problemas con el análisis de expresión diferencial cuando se incluyen genes con muy bajo nivel de expresión (Robinson *et al.*, 2010). Para el análisis de expresión diferencial se utilizó el paquete edgeR; se estimó la variación entre muestras y se calculó la dispersión por medio de "tag wise". Como método estadístico se utilizó el modelo lineal generalizado (GLM), comparando cada tratamiento con el control C1 (Fig. 7B), a fin de evaluar el efecto de cada uno de los CBADs. A fin de evitar resultados con falsos-positivos, solo se consideraron transcritos expresados diferencialmente cuando se obtuvo un FDR  $< 0.01$  y un  $\text{Log}_2\text{FoldChange}$  ( $\text{Log}_2\text{FC}$ )  $\geq 1$  ó  $\leq -1$ . Los transcritos expresados diferencialmente se agruparon por tejidos como sobre- (inducidos) y sub- (reprimidos) regulados para cada tratamiento y se graficaron con ayuda de un diagrama de Venn, para observar transcritos expresados solo por efecto de cada tratamiento. Basados en el perfil de transcritos expresados diferencialmente para cada uno de los tejidos, se realizó una agrupación jerárquica de los tratamientos.

Para determinar los procesos biológicos que se modulan en respuesta a los tratamientos, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional de los transcritos expresados diferencialmente usando BLAST2GO (Götz *et al.*, 2008) y KOBAS (Xie *et al.*, 2011) para categorías de GO (Gene Ontology) y KO (Kegg Orthology), respectivamente con un  $FDR < 0.05$ . Se realizó un filtrado de categorías enriquecidas mediante la selección de los términos más específicos considerando el porcentaje de genes participantes en los procesos biológico o ruta metabólica enriquecida (al menos 5 genes) y considerando un valor de  $FDR < 0.05$  o valor de  $P < 0.001$ . Para cada tejido los transcritos se agruparon con base a sus patrones de expresión en respuesta a los tratamientos, mediante el uso del paquete `gplots` y `hclust` en el programa R (<http://cran.r-project.org/web/packages/gplots/index.html>). La metodología seguida para realizar todo el análisis bioinformático se puede observar en la Fig. 8.



**Figura 8.** Diagrama de flujo que muestra la estrategia utilizada para realizar el análisis bioinformático del transcriptoma de juveniles de almeja *Catarina Argopecten ventricosus*, tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs). EDG: genes expresados diferencialmente.

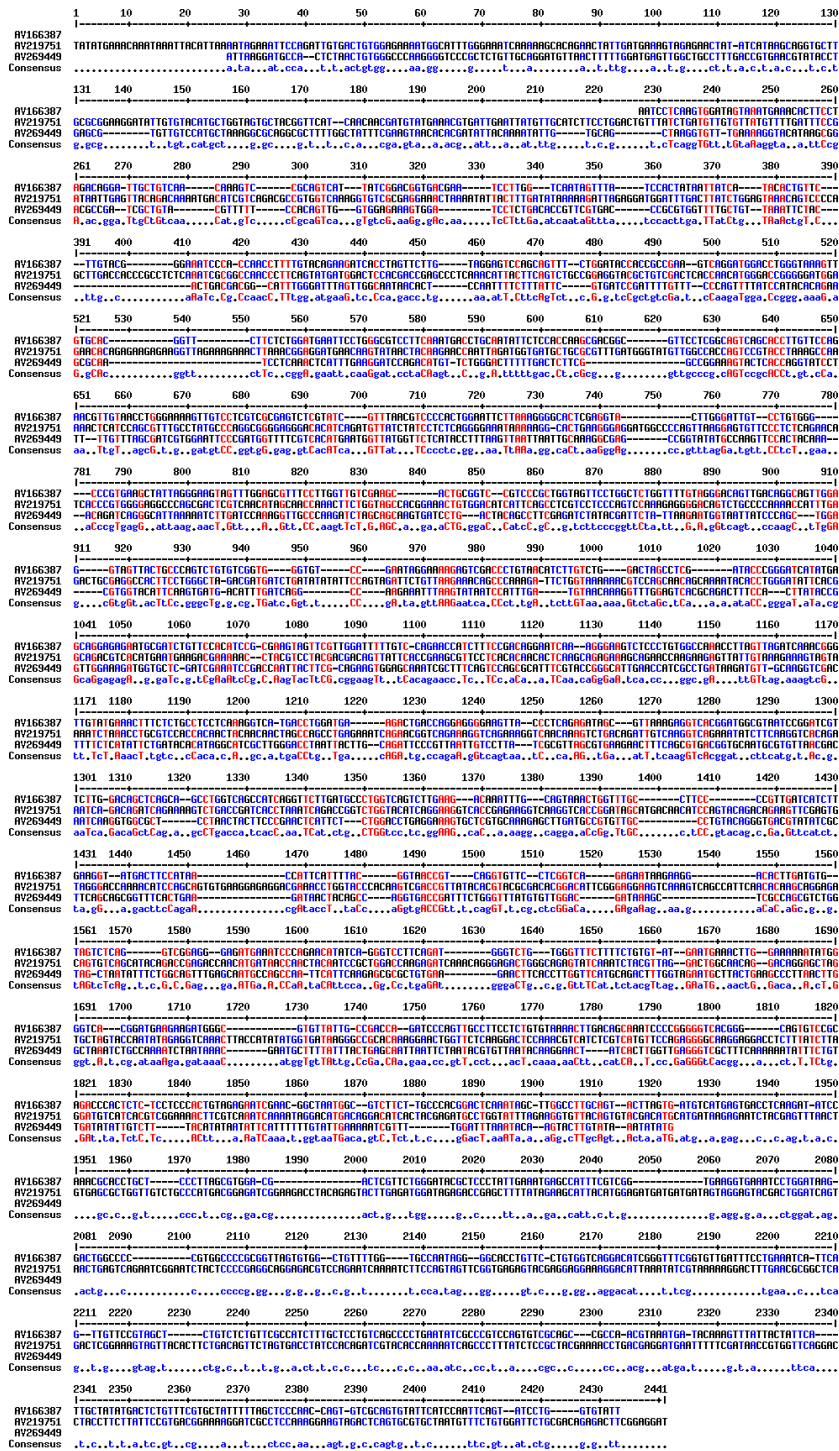
#### **6.11.4 Identificación de genes relacionados con la respuesta inmune**

Considerando las rutas metabólicas o procesos biológicos enriquecidos asociados a respuesta inmune se seleccionaron los transcritos expresados diferencialmente ( $\text{Log}_2\text{FC} > 1$  ó  $< -1$ , y  $\text{FDR} < 0.01$ ) para cada uno de los tratamientos y tejidos evaluados. Con el fin de verificar la inclusión de todos los transcritos de respuesta inmune se realizó una tabla con todos los transcritos expresados diferencialmente y se les asignó su anotación respectiva y posteriormente se realizó una búsqueda de palabras clave, incluyendo la palabra inmune, el nombre de las rutas metabólicas y los procesos biológicos relacionados a respuesta inmune identificados en análisis previos, así como listas de genes de importancia en el sistema inmune de moluscos bivalvos reportados en bibliografía. Esto se realizó con el fin de incluir genes excluidos en el análisis de enriquecimiento.

#### **6.11.5 Validación de genes blanco por RT-qPCR**

Con el fin de validar la expresión diferencial de transcritos y la regulación de rutas metabólicas observadas en el análisis transcriptómico obtenido de los datos RNA-Seq, se evaluaron 14 genes objetivo ( $\text{Log}_2\text{FC} > 1$  ó  $< -1$ , y  $\text{FDR} < 0.01$ ) y 4 genes constitutivos (Coeficiente de variación  $< 0.3$ ,  $\text{Log}_2\text{FC}$  entre  $-1.5$  y  $+1.5$ , y  $\text{FPKM} > 0.3$ ). Específicamente, se seleccionaron genes objetivo involucrados en receptores de reconocimiento de patrones (TLR2, TLR3, TLR6, STING), endocitosis (CAV1, SRC, VPS25, HEXA), citoprotección (HSP90, IAP, CAT) y respuesta inmune (TRAF3, FILA, CYT) (Tabla I). Debido a la presencia de fragmentación en algunas regiones del transcriptoma se tuvieron secuencias distintas con “match” al mismo gen, que al ser alineadas mostraron ser fragmentos y no isoformas, debido a su bajo grado de alineación, por lo que se optó por seleccionar el transcrito más grande para el diseño de primers. En la figura 9 se puede observar un ejemplo de uno de los alineamientos utilizando las secuencias con hit al gen de catalasa.





**Figura 9.** Alineamiento de los unigenes AV166387, AV219751 y AV269449 obtenidos del ensamble transcriptómico *de novo* con hit al gen catalasa.

Todos los pares de primers para amplificar los genes seleccionados se diseñaron con la herramienta Primer3 (Untergasser *et al.*, 2012) y se corroboró que se tuviera una proporción GC no mayor al 60%, una baja temperatura de fusión y ausencia o mínima

presencia de formación de estructuras secundarias, hetero dímeros o dímeros entre pares de primers, utilizando la herramienta OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>). La especificidad de los primers se comprobó mediante PCR, utilizando un pool que incluía todas las muestras de cDNA del diseño experimental, siguiendo la metodología mencionada anteriormente. La concentración de primers utilizada para cada gen se estandarizó para evitar la formación de dímeros y varió en proporción a la abundancia de transcritos. Los fragmentos amplificados para cada gen fueron purificados a partir de los productos amplificados por PCR; cuando se detectó la presencia de dímeros, los fragmentos de interés fueron extraídos mediante la remoción de la banda correspondiente en el gel de agarosa al 1%. Las bandas se purificaron con el kit Wizard<sup>®</sup> SV Gel and Clean-Up System (Promega, USA). Una vez purificados los fragmentos, se enviaron a secuenciar a Macrogen (Seoul, South Korea). Para corroborar la amplificación del producto deseado, las secuencias enviadas por Macrogen fueron alineadas con las secuencias obtenidas en el transcriptoma, utilizando la herramienta MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) y se llevó a cabo una búsqueda con BLAST para corroborar la anotación del gen obtenida en el análisis transcriptómico.

El análisis de RT-qPCR se llevó a cabo siguiendo la metodología de Morelos *et al.*, 2015. El primer paso antes de la cuantificación de la expresión relativa de cada gen, fue calcular el porcentaje de eficiencia para cada par de primers, el cual se obtuvo mediante la obtención de curvas de eficiencia utilizando 6 diluciones seriadas (1:5), formuladas a partir de un pool de cDNA, que incluía todas las muestras de todas las condiciones experimentales evaluadas en este estudio. Las reacciones de RT-qPCR se llevaron a cabo en un equipo CFX96 Touch<sup>™</sup> Real-Time PCR detection system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Las reacciones se llevaron a cabo en 15  $\mu$ L, incluyendo 5  $\mu$ L de cDNA (50 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup>) y 10  $\mu$ L de mix (0.45 u de ADN polimerasa GoTaq Flexi (Promega), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1X Bufer GoTaq Flexi, 0.2 mM dNTP's Mix (Promega), 2x colorante fluorescente Eva Green (Biotium, Inc. Fremont, CA, USA, and 0.15 to 0.45  $\mu$ M cada primer). Los parámetros de amplificación incluyeron 4 min a 95°C, seguido de 39 ciclos de 9 s a 95°C, 30 s a 60°C y 30 s a 72°C; para finalizar con una curva de fusión que permitió confirmar la amplificación de un solo producto, y que el producto amplificado fuera el mismo para todas las muestras. Con el fin de encontrar

los genes más estables, para cada tejido, los Cts de los genes constitutivos fueron evaluados utilizando la herramienta RefFinder ([http://www.leonxie.com/reference\\_gene.php](http://www.leonxie.com/reference_gene.php)). La expresión relativa de los genes se obtuvo según la metodología seguida por Morelos *et al.*, 2015, en la cual, por cada gen se determinó la eficiencia de amplificación determinada por la pendiente calculada de las diluciones seriadas del pool de cDNA. Los valores de eficiencia se obtuvieron de la pendiente, con la fórmula  $E = (10^{(-1/pendiente)} - 1)$  propuesta por Bustin *et al.*, (2009), para ser usados en la expresión relativa de cada gen objetivo y de referencia, mediante la fórmula  $RQ = (1 + E^{(Cq_{promedio} - Cq)})$ , donde RQ es la cantidad relativa (Livak y Schmittgen, 2001). Por último, los valores relativos de expresión se obtuvieron mediante la fórmula  $RE = RQ_t/RQ_{nf}$ , donde t representa al gen objetivo y nf al factor de normalización, que es el promedio geométrico del gen de referencia (Vandesompele *et al.*, 2002). La expresión relativa en el tejido de glándula digestiva se normalizó con la abundancia del gen ribosomal RNA 18S; en manto, con la abundancia del gen de la subunidad alfa-like de la ATPasa transportadora de sodio/potasio, y en branquia, con la abundancia del gen de la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de cAMP.

**Tabla I.** Lista de primers usados para validar las rutas metabólicas reguladas por efecto de los CBADs mediante RT-qPCR. pb: tamaño en pares de bases.

Gen		Secuencia (5'–3')	Tm (°C)	Pb
<b>18S</b>	Forward	AACTTTGTGCGATCGCACGG	60	216
	Reverse	CCTGGCACGGGGAGGTAGTGAC		
<b>ATP1A1</b>	Forward	AGGAGCTGGAGATGGACGAGCACA	60	152
	Reverse	TGGTGTGTAGGGGGAGGGGTCAA		
<b>PRKACA</b>	Forward	AAGCCGTAGACTGGTGGGCGTT	60	212
	Reverse	AGCGTTCCTCAGGTTGCCGTAGCG		
<b>TRAF3</b>	Forward	AGCTTCACAAAGCCCGTGAGCGA	60	162
	Reverse	TGCTTGCCCCTGGAATGACCCA		
<b>FILA</b>	Forward	GGTTCACACAAAGTTCACGCCGCC	60	206
	Reverse	CCTCTCCTGGCTCTGTTACGGTGTA		
<b>CAT</b>	Forward	TTACGTTGGCGGCTGCGACACT	60	134
	Reverse	GTGGTCAGGACATCGGGTTTCGGT		
<b>CAV1</b>	Forward	ACCTGGCACCGCCTATCTTCCTCA	60	220
	Reverse	TGCTGTGAGTTCCTTCGGGCTCA		
<b>HEXA</b>	Forward	AGATGTGCCCTCCTACTGCTGACG	60	115
	Reverse	GGCCGTCCCCTCTACCTTGTCATT		

<b>TLR2</b>	Forward	CGCCCTTACGTGTTCAATTCCAGCA	60	177
	Reverse	ACGCTCCGTTTCCACGCTTCTCT		
<b>TLR3</b>	Forward	AGGAAGCTGTTTGCTCCGCTGATGGA	60	165
	Reverse	AGCACTCTCGAACACTTTGGATTGCCA		
<b>IAP</b>	Forward	ACCGAAACACCCAGTATTCGCCCT	60	159
	Reverse	AGCCCGCCACCACAGAAGAAACA		
<b>CYT</b>	Forward	CGGGTTTGGGCTGGTTTCTCATGTTT	60	198
	Reverse	GGAACAGCAATTAGCATTGTCACCGCA		
<b>HSP90</b>	Forward	GGAGCCTGGAACACACGCAAACA	60	144
	Reverse	CGTGAAGCATCGTCCTCGTCTCCT		
<b>TLR6</b>	Forward	AGCGAATGTTTCCTTGTGTCCAGCG	60	141
	Reverse	TGAAACCACAGATCCAGCACGCCT		
<b>VPS25</b>	Forward	TGGAGGACACCAGAGGAATGGGGGA	60	204
	Reverse	TCCGCCGTCGATGAGTTCAGCA		
<b>SRC</b>	Forward	AGCACGAGAGCCAGTACCTCAGCA	60	202
	Reverse	AGCAGTTAGACCTCCGCCTACCGT		
<b>STING</b>	Forward	ATACCCTGCCCCATTACGGACCCT	60	204
	Reverse	AGCTGTCGTTGGAGGTCGCCAT		

---

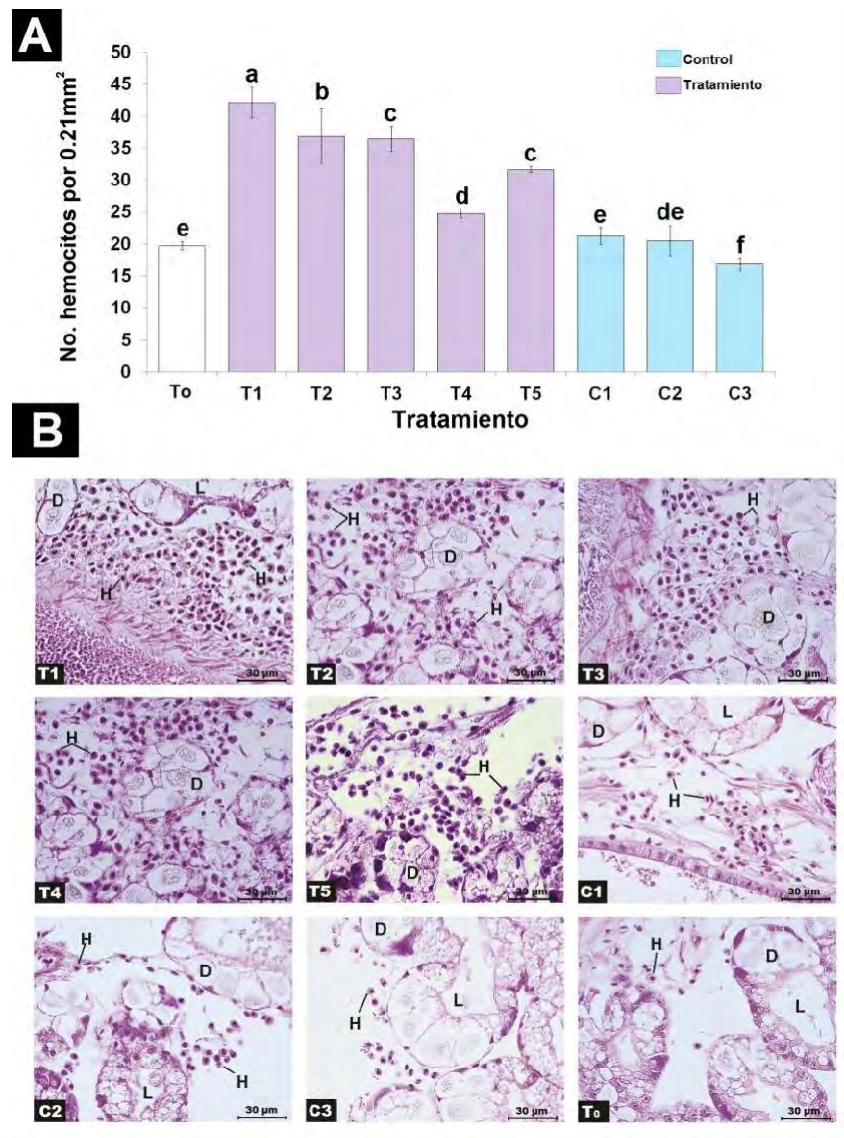
## 6.12 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron por triplicado tomando en cuenta el promedio de cada réplica experimental (3 muestras biológicas por réplica), comprobando normalidad (Kolmogorov-Smirnoff) y homogeneidad de varianzas (Levene). Los datos de análisis bioquímicos, actividad enzimática e histología, se analizaron utilizando ANOVA de una vía y cuando se registraron diferencias significativas se aplicó una prueba *post-hoc* de Tukey a fin de jerarquizar los grupos de medias entre tratamientos (Bhujel, 2008). Para el caso de la expresión diferencial de genes por RT-qPCR, se llevó a cabo una transformación  $\text{Log}_{10}$  (Bhujel, 2008), un ANOVA de una vía, y una prueba de Fisher, para jerarquizar los grupos de medias entre tratamientos. Todas las bases de datos con valores porcentuales se transformaron con arcoseno para llevar a cabo los análisis estadísticos (Zar, 2010). El análisis estadístico se realizó con el software STATISTICA 10 (StatSoft, E.U.A). El nivel de significancia de todas las pruebas se fijó a una  $P \leq 0.05$ . Los datos muestran valores promedios  $\pm$  intervalos de confianza al 95%.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Conteo de hemocitos

El conteo de hemocitos en glándula digestiva mostró un claro efecto asociado al uso de CBADs. El mayor conteo de hemocitos se registró en organismos tratados con T1 (44), T2 (41) y T3 (36), valores significativamente mayores ( $P < 0.00001$ ) a los observados en los organismos de todos los controles experimentales (C1, C2 y C3) y al inicio del experimento (To) (Fig. 10).



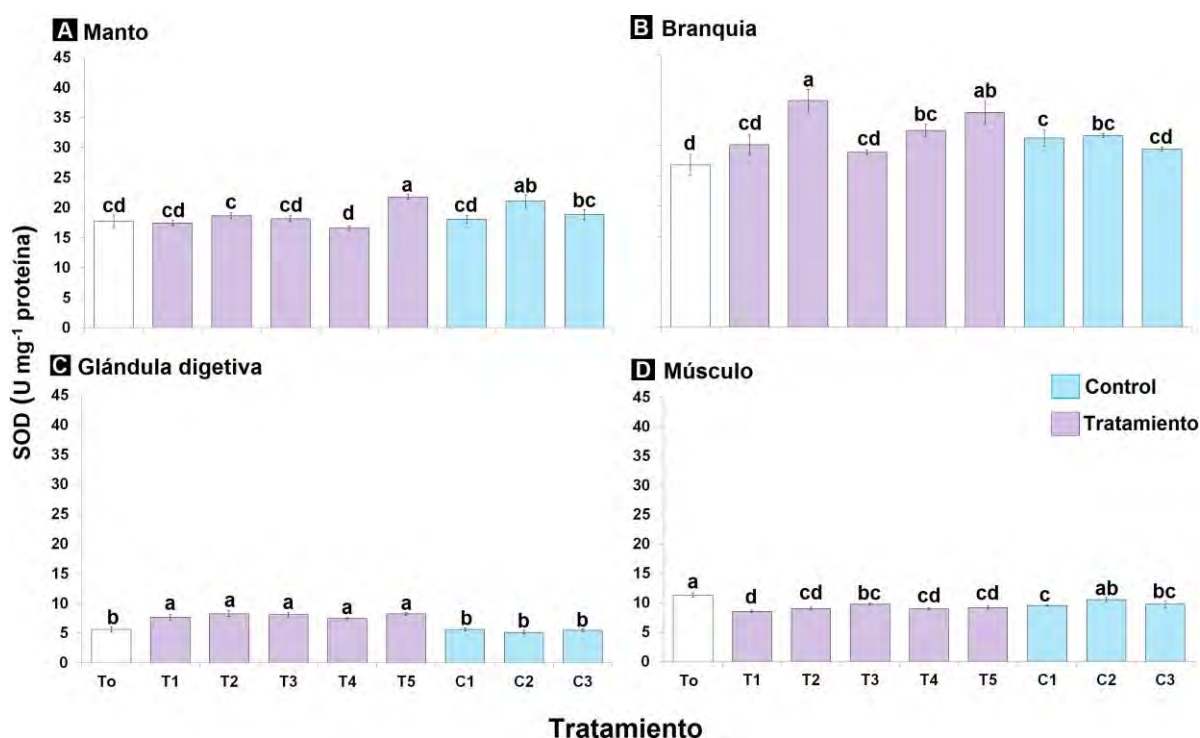
**Figura 10.** A) Conteo de hemocitos en glándula digestiva de juveniles de almeja Catarina *Argopecten ventricosus* tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) durante 21 días. Barras muestran promedio con sus respectivos intervalos de

confianza al 95%. B) Microfotografías a 20X de glándula digestiva de juveniles de almeja *A. ventricosus* tratados con CBADs. D: glándula digestiva, L: lumen de los acinos, H: hemocitos. To: Inicio del experimento, T1: *V. parahaemolyticus* 1D + *V. alginolyticus* 1D, T2: *V. parahaemolyticus* 7C + *V. alginolyticus* 7C, T3: Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D, T4: *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C, T5: VidatoX<sup>®</sup> 31C, C1: Etanol 1C, C2: Etanol 1:100, C3: Agua destilada. Las letras muestran diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA  $P < 0.05$ ).

## 7.2 Bioquímica enzimática

### 7.2.1 Superóxido dismutasa (SOD)

En manto, la actividad SOD fue significativamente mayor ( $P = 0.0008$ ) en los organismos del tratamiento T5 (21  $\text{U mg}^{-1}$  proteína), con respecto a los demás grupos experimentales (16-19  $\text{U mg}^{-1}$  proteína), a excepción del grupo control C2 (20  $\text{U mg}^{-1}$  proteína) (Fig. 11).



**Figura 11.** Actividad superóxido dismutasa (SOD) en manto (A), branquia (B), glándula digestiva (C) y músculo (D) de juveniles de almeja *Catarina Argopecten ventricosus* tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBSDs), durante 21 días. Barras muestran promedio con sus respectivos intervalos de confianza al 95%. To: Inicio del experimento, T1: *V. parahaemolyticus* 1D + *V. alginolyticus* 1D, T2: *V.*

*parahaemolyticus* 7C + *V. alginolyticus* 7C, T3: Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D, T4: *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C, T5: VidatoX<sup>®</sup> 31C, C1: Etanol 1C, C2: Etanol 1:100, C3: Agua destilada. Las letras muestran diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA  $P < 0.05$ ).

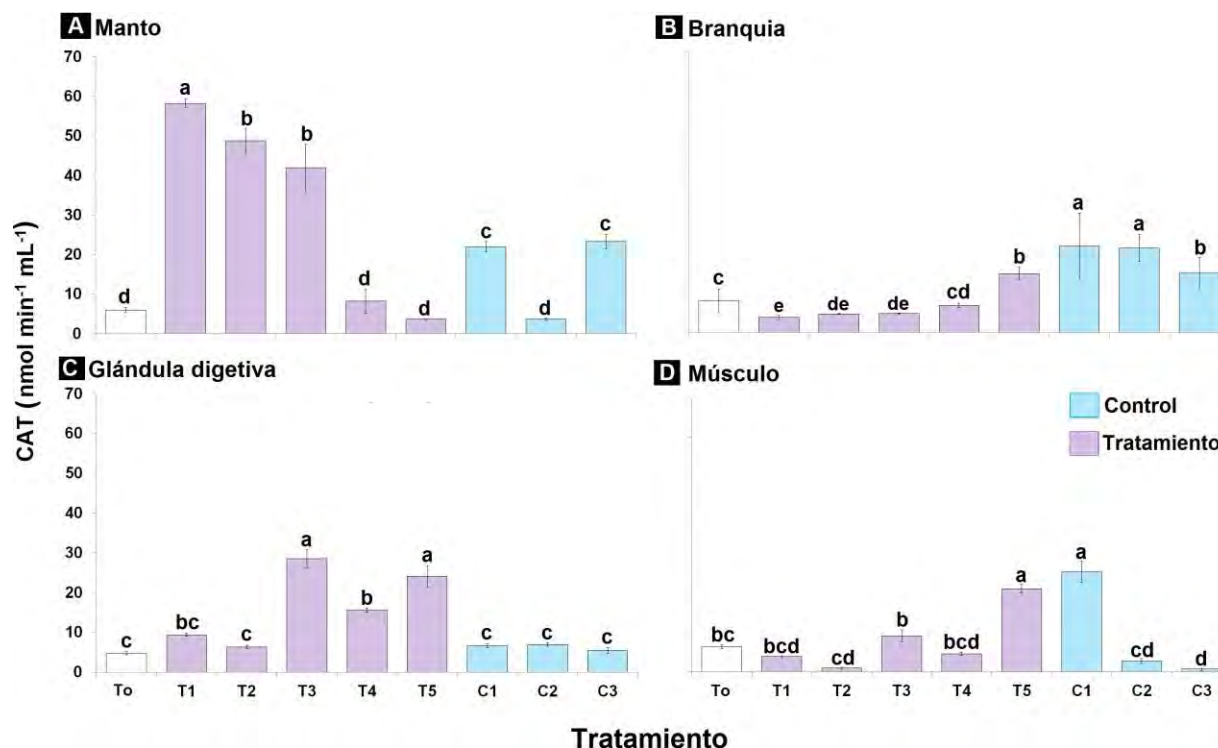
Durante la evaluación final, la mayor actividad enzimática SOD se registró en branquia ( $P = 0.0004$ ), particularmente en el tratamiento T2 (37 U  $\text{mg}^{-1}$  proteína) con el cual se obtuvo la mayor actividad ( $P = 0.0007$ ) en comparación a todos los grupos experimentales (26-32 U  $\text{mg}^{-1}$  proteína), a excepción de los organismos que recibieron el tratamiento T5 (35 U  $\text{mg}^{-1}$  proteína). En glándula digestiva, la mayor actividad SOD ( $P < 0.00001$ ) se registró en todos los grupos tratados con CBADs (7 – 8 U  $\text{mg}^{-1}$  proteína) y la menor actividad se registró al inicio del experimento ( $T_0$ ) (5 U  $\text{mg}^{-1}$  proteína) y en todos los grupos control (5 U  $\text{mg}^{-1}$  proteína). En músculo, la mayor actividad SOD ( $P = 0.00008$ ) se registró también en al inicio del experimento ( $T_0$ ) (11 U  $\text{mg}^{-1}$  proteína) en comparación con el resto de los grupos experimentales (8-9 U  $\text{mg}^{-1}$  proteína), a excepción de las almejas del grupo control C2 (10 U  $\text{mg}^{-1}$  proteína) que se trataron con etanol diluido y dinamizado (Fig. 11).

### 7.2.2 Catalasa (CAT)

Al final del bioensayo, la mayor actividad CAT se registró en manto, comparado con los demás tejidos evaluados ( $P = 0.00006$ ). Los valores máximos ( $P < 0.00001$ ) se registraron en organismos tratados con T1 (58  $\text{nmol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$ ), T2 (51  $\text{nmol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$ ) y T3 (47  $\text{nmol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$ ) en comparación a los demás grupos experimentales (3 – 23  $\text{nmol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$ ) (Fig. 12). En branquia, la actividad CAT presentó mayor actividad ( $P = 0.0005$ ) en organismos del grupo control C1 (21  $\text{nmol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$ ), que recibieron etanol dinamizado y C2 (20  $\text{nmol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$ ), que recibieron etanol diluido, comparado con los demás grupos experimentales (3-14  $\text{nmol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$ ). En glándula digestiva, la mayor actividad CAT ( $P < 0.00001$ ) se registró en los organismos tratados con T3 (30  $\text{nmol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$ ) y T5 (21  $\text{nmol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$ ), en comparación a los demás grupos experimentales (4 – 15  $\text{nmol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$ ). La actividad CAT en músculo de organismos pertenecientes a los grupos experimentales T5 (20  $\text{nmol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$ ) y C1 (23  $\text{nmol min}^{-1}$



mL<sup>-1</sup>), fue significativamente mayor ( $P < 0.00001$ ) a todos los demás grupos evaluados (0.73 – 10 nmol min<sup>-1</sup> mL<sup>-1</sup>) (Fig. 12).



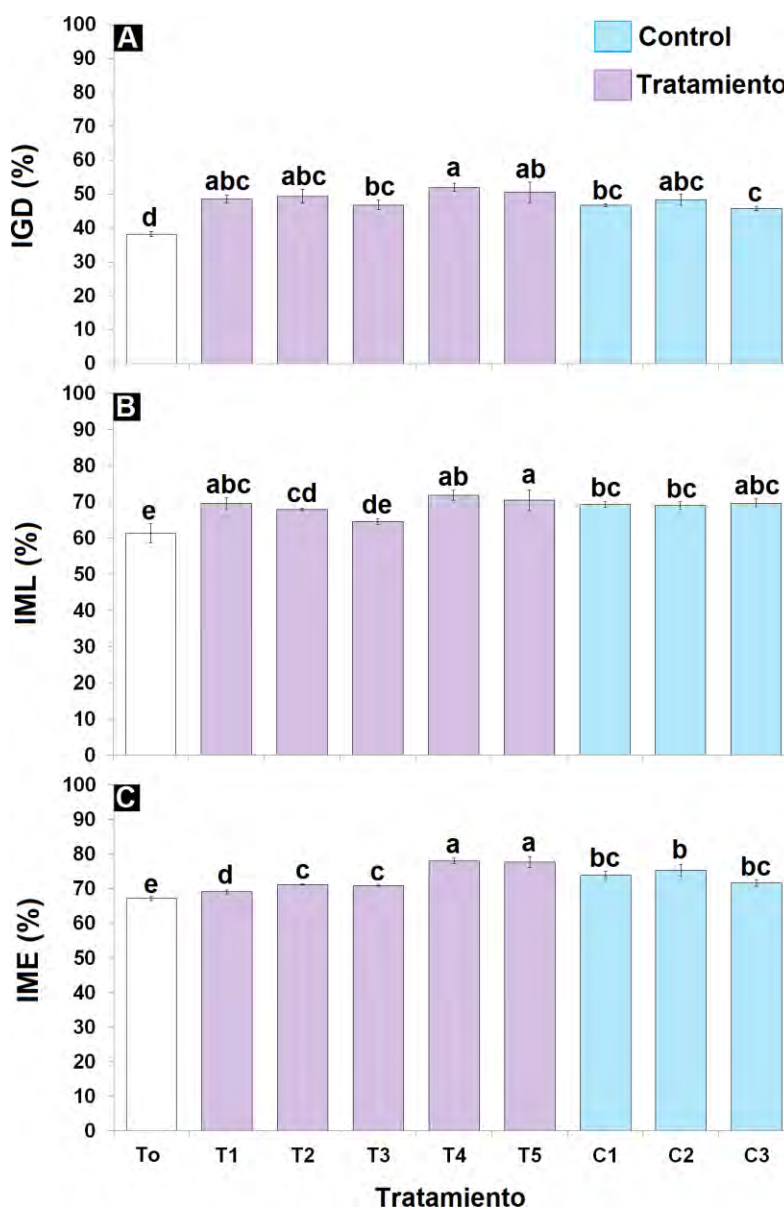
**Figura 12.** Actividad catalasa (CAT) en manto (A), branquia (B), glándula digestiva (C) y músculo (D), de juveniles de almeja Catarina *Argopecten ventricosus* tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) durante 21 días. Barras muestran promedio con sus respectivos intervalos de confianza al 95%. To: Inicio del experimento, T1: *V. parahaemolyticus* 1D + *V. alginolyticus* 1D, T2: *V. parahaemolyticus* 7C + *V. alginolyticus* 7C, T3: Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D, T4: *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C, T5: VidatoX<sup>®</sup> 31C, C1: Etanol 1C, C2: Etanol 1:100, C3: Agua destilada. Las letras muestran diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA  $P < 0.05$ ).

## 7.3 Análisis histológico

### 7.3.1 Índice muscular y digestivo

El índice de glándula digestiva (IGD), fue significativamente mayor ( $P < 0.0004$ ) en todos los organismos al final del experimento (45-52%), en comparación a los valores determinados en To (38%). Entre controles y tratamientos no se observaron diferencias significativas (Fig. 13).





**Figura 13.** Índices histológicos IGD (A), IML (B) y IME (C) en juveniles de almeja Catarina *Argopecten ventricosus* tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) durante 21 días. Barras muestran promedio con sus respectivos intervalos de confianza al 95%. To: Inicio del experimento, T1: *V. parahaemolyticus* 1D + *V. alginolyticus* 1D, T2: *V. parahaemolyticus* 7C + *V. alginolyticus* 7C, T3: Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D, T4: *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C, T5: VidatoX<sup>®</sup> 31C, C1: Etanol 1C, C2: Etanol 1:100, C3: Agua destilada. Las letras muestran diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA P<0.05).

Al finalizar el experimento el índice de músculo liso (IML) de los organismos (67-73%) fue mayor ( $P = 0.005$ ) que al inicio del experimento (62%), con excepción de los organismos tratados con T3 (64%), sin embargo no se observaron incrementos de este índice por efecto de los tratamientos en comparación con los controles. En el caso del índice de músculo estriado (IME), el mayor porcentaje ( $P < 0.00001$ ) se observó en organismos tratados con T4 (77%) y T5 (76%), en comparación con los grupos control (C1, C2 y C3), los cuales registraron valores entre el 67 y 73% (Fig. 13).

## 7.4 Análisis bioquímicos

### 7.4.1 Carbohidratos totales

El contenido de carbohidratos en manto fue mayor ( $P < 0.00001$ ) en To ( $15 \text{ mg g}^{-1}$ ) y en los organismos que recibieron el tratamiento T4 ( $14 \text{ mg g}^{-1}$ ), comparado con el resto de los grupos experimentales ( $11 - 13 \text{ mg g}^{-1}$ ) (Tabla II). En branquia, el mayor contenido de carbohidratos ( $P < 0.00001$ ) se registró en organismos del tratamiento C1 ( $14 \text{ mg g}^{-1}$ ), comparado con To y el resto de grupos experimentales ( $10 - 13 \text{ mg g}^{-1}$ ). En comparación con los demás tejidos, el mayor contenido de carbohidratos se registró en glándula digestiva ( $P < 0.00001$ ), y los valores más altos correspondieron a los organismos tratados con T3 ( $126 \text{ mg g}^{-1}$ ) y T5 ( $126 \text{ mg g}^{-1}$ ), comparado con los valores de To y el resto de los grupos experimentales ( $68 \text{ mg g}^{-1} - 125 \text{ mg g}^{-1}$ ). El contenido de carbohidratos en músculo fue significativamente mayor ( $P < 0.00001$ ) en los organismos tratados con T4 ( $50 \text{ mg g}^{-1}$ ), en comparación con valores del inicio del experimento (To), y del final del experimento para el resto de los tratamientos y controles experimentales ( $17 - 37 \text{ mg g}^{-1}$ ) (Tabla II).

### 7.4.2 Proteínas totales

El mayor contenido de proteínas en manto ( $P < 0.00001$ ) se reportó en To ( $486 \text{ mg g}^{-1}$ ), y en aquellos tratados con T5 ( $506 \text{ mg g}^{-1}$ ) y C2 ( $480 \text{ mg g}^{-1}$ ), en comparación con el resto de los grupos experimentales ( $285 \text{ mg g}^{-1} - 424 \text{ mg g}^{-1}$ ) (Tabla II). En branquia, el mayor contenido de proteína ( $P < 0.00001$ ) se registró To ( $390 \text{ mg g}^{-1}$ ), comparando

con el resto de los grupos experimentales ( $235 \text{ mg g}^{-1} - 296 \text{ mg g}^{-1}$ ). En glándula digestiva el mayor contenido de proteínas ( $P < 0.00001$ ) se observó en To ( $479 \text{ mg g}^{-1}$ ), comparado al resto de los grupos experimentales ( $300 \text{ mg g}^{-1} - 391 \text{ mg g}^{-1}$ ) al final del bioensayo. En músculo, el contenido de proteínas fue mayor a los demás tejidos ( $P < 0.00001$ ), y al igual que en glándula digestiva y branquia, el mayor contenido de proteínas ( $P < 0.00001$ ) se registró en To ( $561 \text{ mg g}^{-1}$ ), comparado con el resto de los grupos experimentales al fin del mismo ( $400 \text{ mg g}^{-1} - 492 \text{ mg g}^{-1}$ ) (Tabla II).

### 7.4.3 Lípidos totales

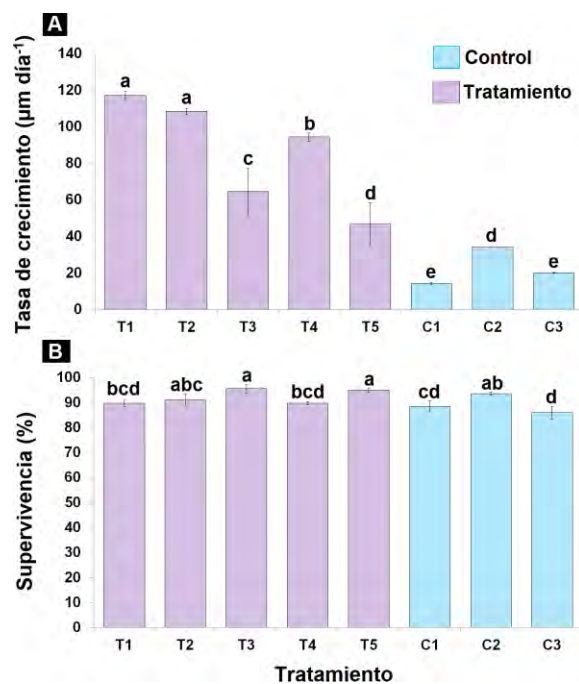
En cuanto al contenido de lípidos en manto, en los organismos del grupo control C3 ( $27 \text{ mg g}^{-1}$ ) y T4 ( $26 \text{ mg g}^{-1}$ ) se registraron los mayores valores ( $P < 0.00001$ ), en comparación a los valores registrados en To ( $5 \text{ mg g}^{-1}$ ), y en aquellos tratados con T1 ( $20 \text{ mg g}^{-1}$ ), T2 ( $19 \text{ mg g}^{-1}$ ), T5 ( $15 \text{ mg g}^{-1}$ ) y C1 ( $22 \text{ mg g}^{-1}$ ) (Tabla II). El contenido de lípidos en branquia de los organismos tratados con T3 y C2 ( $30 \text{ mg g}^{-1}$ ,  $29 \text{ mg g}^{-1}$ ), fue mayor ( $P < 0.00001$ ) con respecto a To y a los demás grupos experimentales al final del experimento ( $2 - 23 \text{ mg g}^{-1}$ ). En glándula digestiva se registró el mayor contenido de lípidos ( $P < 0.00001$ ), en comparación a los demás tejidos evaluados. En este tejido, los organismos de los tratamientos T2 ( $85 \text{ mg g}^{-1}$ ) y T4 ( $82 \text{ mg g}^{-1}$ ) presentaron un mayor contenido de lípidos en comparación ( $P < 0.00001$ ) con To y los demás grupos experimentales ( $11 - 75 \text{ mg g}^{-1}$ ). Con respecto al contenido de lípidos en músculo, en los organismos tratados con T4 ( $22 \text{ mg g}^{-1}$ ) se registraron los mayores valores ( $P < 0.00001$ ), en comparación con To y para todos los grupos experimentales ( $2 - 19 \text{ mg g}^{-1}$ ) al finalizar el bioensayo (Tabla II).

**Tabla II.** Composición bioquímica de manto, branquia, glándula digestiva y músculo de juveniles de almeja *Catarina Argopecten ventricosus* tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) durante 21 días. Promedio  $\pm$  intervalo de confianza al 95%. To: Inicio del experimento, T1: *V. parahaemolyticus* 1D + *V. alginolyticus* 1D, T2: *V. parahaemolyticus* 7C + *V. alginolyticus* 7C, T3: Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D, T4: *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C, T5: VidatoX<sup>®</sup> 31C, C1: Etanol 1C, C2: Etanol 1:100, C3: Agua destilada. Las letras muestran diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA  $P < 0.05$ ).

	To	T1	T2	T3	T4	T5	C1	C2	C3
<b>Carbohidratos (mg g<sup>-1</sup>)</b>									
Manto	15 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	13 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	12 $\pm$ 0.2 <sup>bc</sup>	13 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	14 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	12 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	13 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>	11 $\pm$ 0.7 <sup>c</sup>	12 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>
Branquia	12 $\pm$ 0.2 <sup>cd</sup>	13 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	11 $\pm$ 0.2 <sup>d</sup>	12 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup>	10 $\pm$ 0.4 <sup>f</sup>	12 $\pm$ 0.04 <sup>cd</sup>	14 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	11 $\pm$ 0.03 <sup>e</sup>	10 $\pm$ 0.5 <sup>e</sup>
Glándula	68 $\pm$ 0.7 <sup>e</sup>	117 $\pm$ 2.4 <sup>d</sup>	118 $\pm$ 3.6 <sup>cd</sup>	126 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>	121 $\pm$ 4.6 <sup>bcd</sup>	126 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	122 $\pm$ 4 <sup>abc</sup>	125 $\pm$ 0.9 <sup>ab</sup>	117 $\pm$ 1.3 <sup>d</sup>
Músculo	17 $\pm$ 2.9 <sup>e</sup>	37 $\pm$ 0.001 <sup>b</sup>	31 $\pm$ 0.14 <sup>bc</sup>	36 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	50 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>	23 $\pm$ 0.5 <sup>de</sup>	36 $\pm$ 4.6 <sup>b</sup>	36 $\pm$ 8.7 <sup>b</sup>	25 $\pm$ 2.9 <sup>cd</sup>
<b>Proteínas (mg g<sup>-1</sup>)</b>									
Manto	486 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	314 $\pm$ 4.5 <sup>d</sup>	403 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>	348 $\pm$ 8.2 <sup>c</sup>	285 $\pm$ 4.3 <sup>d</sup>	506 $\pm$ 9.8 <sup>a</sup>	424 $\pm$ 20 <sup>b</sup>	480 $\pm$ 21 <sup>a</sup>	409 $\pm$ 38 <sup>b</sup>
Branquia	390 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	281 $\pm$ 3 <sup>bc</sup>	296 $\pm$ 29 <sup>b</sup>	260 $\pm$ 2.7 <sup>de</sup>	249 $\pm$ 9.2 <sup>ef</sup>	243 $\pm$ 4 <sup>ef</sup>	276 $\pm$ 2.9 <sup>cd</sup>	240 $\pm$ 4.4 <sup>f</sup>	235 $\pm$ 2.4 <sup>f</sup>
Glándula	479 $\pm$ 10 <sup>a</sup>	391 $\pm$ 6 <sup>b</sup>	368 $\pm$ 44 <sup>bc</sup>	320 $\pm$ 4.1 <sup>efg</sup>	300 $\pm$ 4.3 <sup>g</sup>	311 $\pm$ 1.9 <sup>fg</sup>	361 $\pm$ 13 <sup>cd</sup>	335 $\pm$ 1.7 <sup>def</sup>	347 $\pm$ 7.5 <sup>cd</sup>
Músculo	561 $\pm$ 3.5 <sup>a</sup>	492 $\pm$ 16 <sup>b</sup>	448 $\pm$ 12 <sup>c</sup>	410 $\pm$ 1 <sup>ef</sup>	400 $\pm$ 10.8 <sup>f</sup>	421 $\pm$ 14 <sup>de</sup>	434 $\pm$ 16 <sup>cd</sup>	421 $\pm$ 0.8 <sup>de</sup>	452 $\pm$ 5.6 <sup>c</sup>
<b>Lípidos (mg g<sup>-1</sup>)</b>									
Manto	5 $\pm$ 0.03 <sup>f</sup>	20 $\pm$ 1.8 <sup>cd</sup>	19 $\pm$ 1 <sup>d</sup>	22 $\pm$ 1.3 <sup>bc</sup>	26 $\pm$ 2.7 <sup>a</sup>	15 $\pm$ 0.1 <sup>e</sup>	22 $\pm$ 0.7 <sup>bc</sup>	24 $\pm$ 1.3 <sup>ab</sup>	27 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>
Branquia	2 $\pm$ 0.4 <sup>f</sup>	23 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	21 $\pm$ 1.2 <sup>d</sup>	30 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	20 $\pm$ 0.9 <sup>de</sup>	23 $\pm$ 0.5 <sup>bc</sup>	19 $\pm$ 1.5 <sup>e</sup>	29 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	21 $\pm$ 0.9 <sup>cd</sup>
Glándula	11 $\pm$ 0.2 <sup>e</sup>	58 $\pm$ 1.4 <sup>d</sup>	85 $\pm$ 5.3 <sup>a</sup>	75 $\pm$ 1.6 <sup>b</sup>	82 $\pm$ 1.5 <sup>ab</sup>	51 $\pm$ 0.2 <sup>d</sup>	56 $\pm$ 2.8 <sup>cd</sup>	68 $\pm$ 2.3 <sup>c</sup>	55 $\pm$ 9.5 <sup>d</sup>
Músculo	3 $\pm$ 0.01 <sup>f</sup>	19 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup>	16 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup>	18 $\pm$ 1.1 <sup>bc</sup>	22 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>	7 $\pm$ 0.4 <sup>e</sup>	18 $\pm$ 0.8 <sup>bc</sup>	13 $\pm$ 0.1 <sup>d</sup>	17 $\pm$ 2.4 <sup>c</sup>

## 7.5 Supervivencia y crecimiento

La supervivencia fue mayor ( $P = 0.011$ ) en los organismos tratados con T3 (95%) y T5 (94%), con respecto al grupo control C1 (88%) y C3 (85%). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas con respecto al control C2 (93%). Con relación al crecimiento, en los organismos tratados con T1 (117  $\mu\text{m día}^{-1}$ ) y T2 (108  $\mu\text{m día}^{-1}$ ), se registró la mayor tasa de crecimiento. Los tratamientos T1 a T4 mostraron un incremento de la tasa de crecimiento ( $P < 0.00001$ ) respecto a los grupos control C1 (14  $\mu\text{m día}^{-1}$ ), C2 (34  $\mu\text{m día}^{-1}$ ) y C3 (20  $\mu\text{m}$ ) (Fig. 14).



**Figura 14.** Tasa de crecimiento (A) y supervivencia (B) de juveniles de almeja Catarina *Argopecten ventricosus* tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) durante 21 días. Barras muestran promedio con sus respectivos intervalos de confianza al 95%. To: Inicio del experimento, T1: *V. parahaemolyticus* 1D + *V. alginolyticus* 1D, T2: *V. parahaemolyticus* 7C + *V. alginolyticus* 7C, T3: Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D, T4: *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C, T5: VidatoX<sup>®</sup> 31C, C1: Etanol 1C, C2: Etanol 1:100, C3: Agua destilada. Las letras muestran diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA P<0.05).

## 7.6 Análisis Transcriptómico

### 7.6.1 Ensamblaje del transcriptoma y anotación funcional

En total se generaron 423, 656, 502 lecturas (reads) crudas pareadas, con un promedio de 26 millones de lecturas crudas por librería incluyendo secuencias “forward” y “reverse” (R1 y R2) a excepción de la librería seis la cual presento más de 70 millones de lecturas (Tabla III). Seguido del proceso de filtración de lecturas crudas, se tuvo un total de 372,879,514 de lecturas de alta calidad con una longitud de 150 pb, las cuales se utilizaron para el ensamble transcriptómico “*de novo*”.

Como resultado final del ensamble “*de novo*” del transcriptoma de la almeja Catarina *A. ventricosus* tratada con CBADs, se generaron 191,432 transcritos con una longitud

máxima de 36,697 pares de bases y una longitud mínima de 184 pares de bases. En promedio, los transcritos tuvieron una longitud de 863 pares de bases y una N50 de 1,123 pares de bases (Fig. 15A). La distribución de tamaño de transcritos mostró una mayor abundancia de aquellos con una longitud de entre 100 y 600 pares de base, y una menor abundancia en transcritos entre los 2,000 y 2,200 pares de bases (Fig. 15B). La evaluación con la herramienta BUSCO para observar la integridad de los transcritos ensamblados, comparados con las bases de datos Metazoa odb9, mostró un 79.4% de transcritos completos y un 17% de transcritos fragmentados (Fig. 15D).

**Tabla III.** Librerías producto de la secuenciación masiva por tecnología RNA-Seq. RB: Réplica biológica.

No. Librería	Tejido	Tratamiento	Replica	Total de lecturas (R1+R2)
1	Branquia	T1	RB1	21,145,906
2	Branquia	T2	RB1	22,643,845
3	Branquia	T3	RB1	20,465,057
4	Branquia	T4	RB1	24,618,320
5	Branquia	T5	RB1	20,359,503
6	Branquia	C1	RB1	72,386,541
7	Branquia	C2	RB1	21,098,241
8	Branquia	C3	RB1	27,782,278
9	Manto	T1	RB1	20,408,586
10	Manto	T2	RB1	20,600,710
11	Manto	T3	RB1	20,967,118
12	Manto	T4	RB1	22,719,584
13	Manto	T5	RB1	22,892,789
14	Manto	C1	RB1	23,827,856
15	Manto	C2	RB1	20,379,157
16	Manto	C3	RB1	22,176,541
17	Branquia	T1	RB2	20,304,242
18	Branquia	T2	RB2	29,584,017
19	Branquia	T3	RB2	31,448,316
20	Branquia	T4	RB2	39,141,949
21	Branquia	T5	RB2	30,097,592
22	Branquia	C1	RB2	28,815,772
23	Branquia	C2	RB2	22,773,507
24	Branquia	C3	RB2	23,245,232
25	Manto	T1	RB2	27,958,082
26	Manto	T2	RB2	24,400,630
27	Manto	T3	RB2	24,565,059

28	Manto	T4	RB2	30,114,871
29	Manto	T5	RB2	29,025,672
30	Manto	C1	RB2	21,448,316
31	Manto	C2	RB2	31,641,005
32	Manto	C3	RB2	38,577,530

La anotación funcional del transcriptoma de juveniles de *A. ventricosus* tratados con CBADs permitió anotar el 32% (62,548 transcritos) del transcriptoma con al menos una de las bases de datos utilizadas. El mayor número de transcritos anotados (60,157 hits) se obtuvo utilizando la base de datos del pectínido *Mizuphecten yesseniosis*, un resultado esperado por ser una especie filogenéticamente cercana a nuestro organismo de estudio (Fig. 15A). El menor número de secuencias anotadas se observó cuando se utilizó la base de datos KEGG (17,487), la cual está más enfocada a organismos modelo y humanos (Fig. 15A).

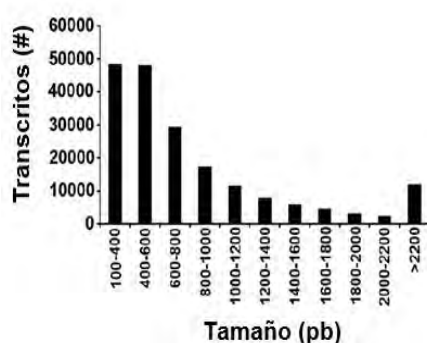
### A Estadísticas transcriptóma y anotación funcional

Secuenciación	Ensamble	Anotación
Lecturas crudas	423,656,502	Número de transcritos
Lecturas filtradas	372,879,514	Longitud promedio (pb)
Tamaño de la lectura (pb)	150	N50 (bp)
		Transcrito de mayor longitud (pb)
		Transcrito de menor longitud (pb)

Base de Datos	Número de Hits	Base de Datos	Número de Hits
NR	43,541	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	15,425
GO	47,313	<i>Crassostrea gigas</i>	46,001
KO	17,487	<i>Crassostrea virginica</i>	45,630
SwissProt	33,265	<i>Mizuphecten yesseniosis</i>	60,157
RefSeq	46,404		

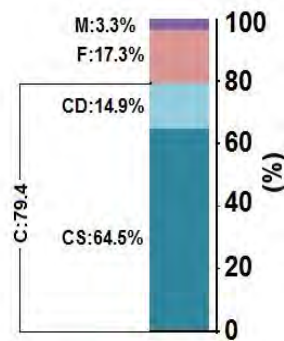
### B Distribución de tamaños de los transcritos ensamblados



### C Distribución de especies (blast top hits)



### D BUSCO

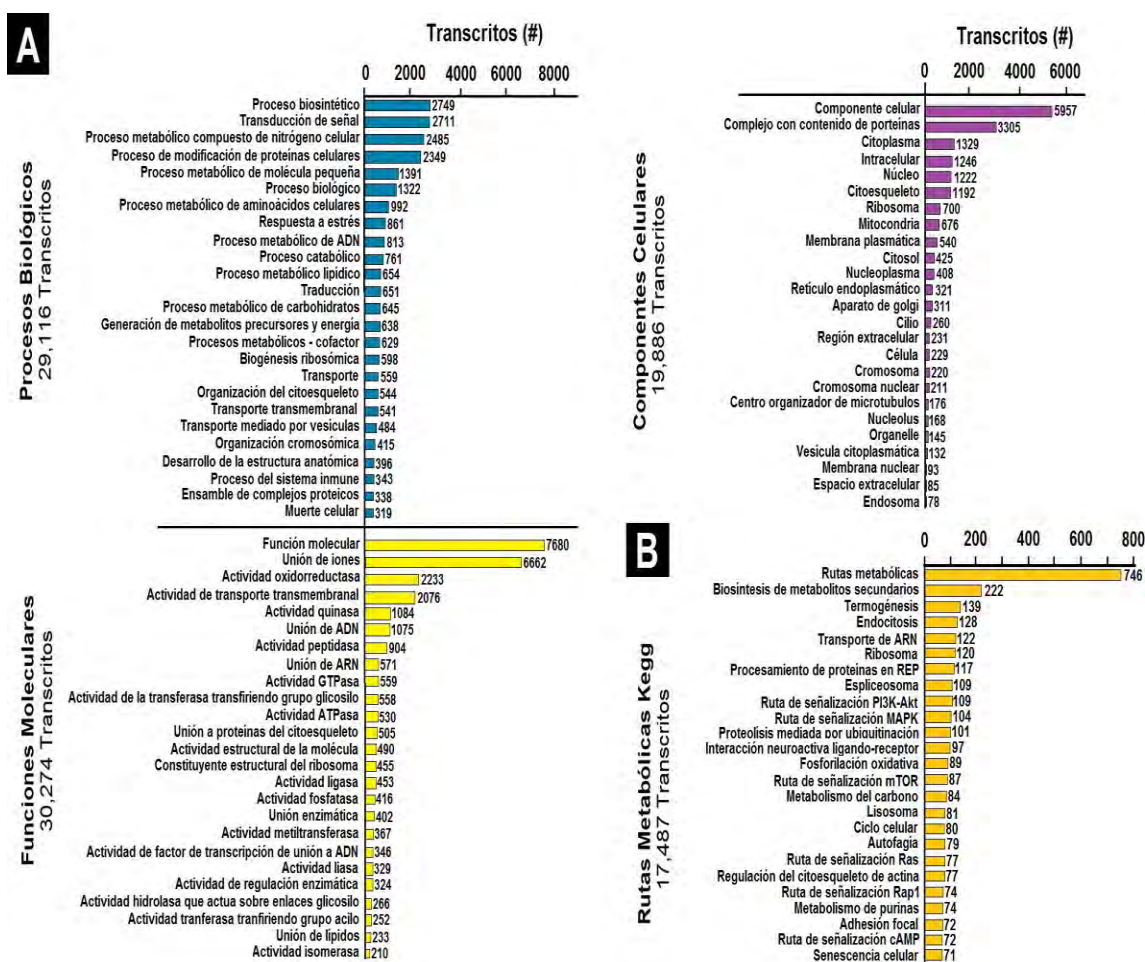


**Figura 15.** A) Resumen de la estadística de ensamble y anotación del transcriptoma de juveniles de almeja Catarina *Argopecten ventricosus* tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) durante 21 días. B) Distribución de transcritos presentes en el transcriptoma en relación a su tamaño. C) Especies con las que se tuvo un mayor número de hits. D) Resultados de BUSCO. C: transcritos completos; CS:



transcritos completos con una sola copia; CD: transcritos completos con duplicado; F: transcritos fragmentados; M: transcritos faltantes.

Las especies con las que se tuvo un mayor número de anotaciones utilizando la base de datos nr de NCBI, correspondieron al ostreido *Crassostrea gigas* (18,339 hits), el molusco bivalvo más estudiado a nivel molecular, seguido de *Mizuhopecten yessoensis* (12,104 hits), organismo altamente relacionado filogenéticamente con *A. ventricosus* por tratarse de un pectínido. Con la base de datos de *A. ventricosus* se obtuvo un número bajo de hits (286), debido principalmente a la poca información que se ha generado referente a la especie, a nivel molecular (Fig. 15C).



**Figura 16.** Principales 25 términos de gene ontology y rutas metabólicas anotadas en el transcriptoma de juveniles de almeja *Argopecten ventricosus* tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) durante 21 días. A) Histogramas que muestran los principales 25 procesos biológicos (barras azules), funciones



moleculares (barras amarillas) y componentes celulares (barras moradas) y B) rutas metabólicas (barras naranja).

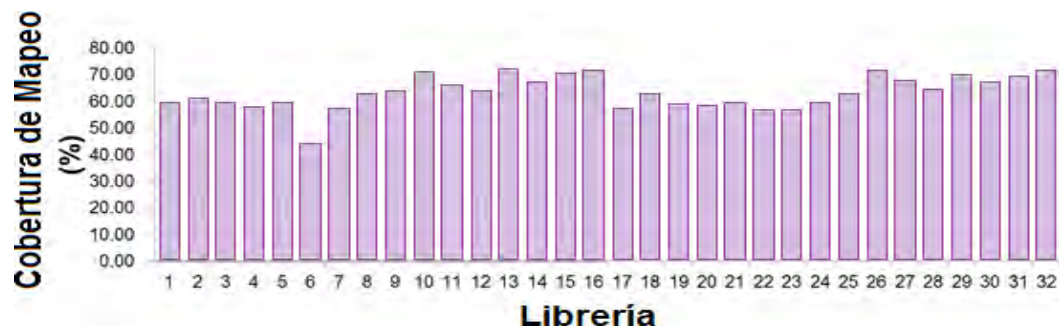
Como resultado de la categorización funcional del transcriptoma de juveniles de *A. ventricosus* en BLAST2GO, se obtuvieron 47,313 transcritos anotados, de los cuales 29,116 transcritos se relacionaron a diversos procesos biológicos, entre los cuales destacaron procesos de biosíntesis (2,749), transducción de señal (2,711) y metabolismo de compuestos celulares nitrogenados (2,485). Un total de 30,274 transcritos se asignaron a funciones moleculares, destacando las de unión de iones (6,662), actividad oxidoreductasa (2,233) y actividad de transporte transmembranal (2,076). Por último, 19,886 transcritos anotados estuvieron asociados a componentes celulares, de los cuales el mayor número se relacionó a complejos con contenido de proteínas (3,305), componentes citoplasmáticos (1,329) y componentes intracelulares (1,246) (Fig. 16A).

Para el caso de la anotación generada con la base de datos de KEGG, se observó un total de 17,487 de transcritos anotados, los cuales estuvieron implicados principalmente en rutas metabólicas (746), biosíntesis de metabolitos secundarios (222), termogénesis (139) y endocitosis (128) (Fig. 16B).

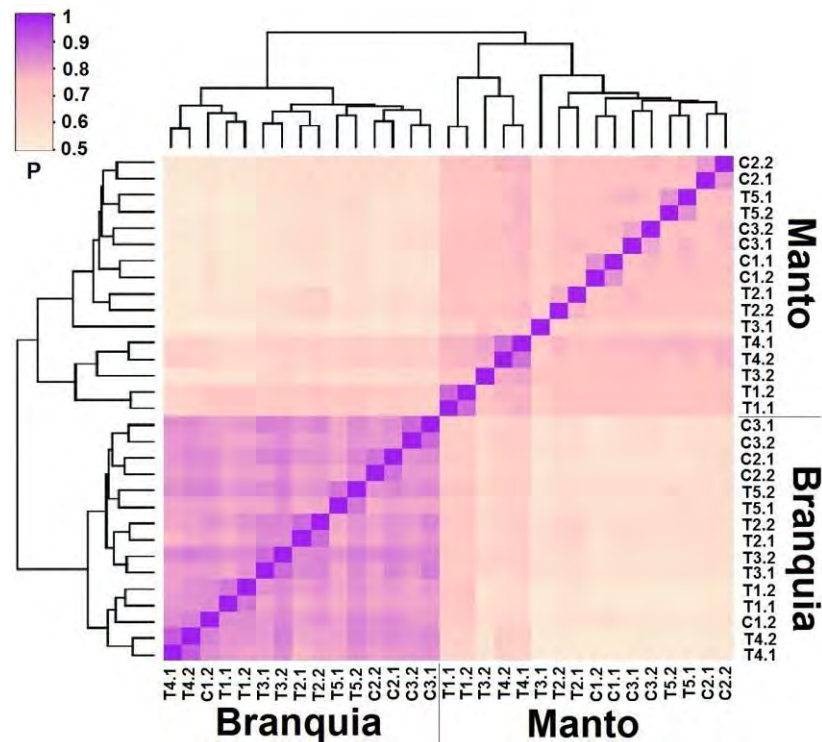
### **7.6.2 Análisis de expresión diferencial de transcritos**

Para llevar a cabo la expresión diferencial de transcritos, se realizó el mapeo de cada librería utilizando de referencia el transcriptoma ensamblado. En promedio, de cada librería se mapeó un 63 % de sus lecturas. Las librerías 13, 15 y 26 tuvieron un mayor porcentaje de mapeo (71%), mientras que la librería 6 fue eliminada del análisis porque tuvo el menor porcentaje de mapeo (43%) y presentó contaminación, ya que el archivo contenía lecturas correspondientes a plantas (Fig. 17).

El conteo de las lecturas normalizado por FPKM, utilizado para correlacionar los datos de las distintas replicas experimentales mediante una correlación de Pearson, mostró una agrupación de tratamientos con sus respectivas réplicas. Todos los tratamientos y controles mostraron una correlación mayor a 0.96 con sus respectivas réplicas, a excepción de T2 (R=0.88) y C2 (R=0.85) (Fig. 18).



**Figura 17.** Porcentaje de lecturas alineadas y mapeadas con el transcriptoma de juveniles de almeja Catarina *Argopecten ventricosus* tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) durante 21 días.



**Figura 18.** Gráfica tipo heatmap en la que se contrastan todas las librerías según su coeficiente de correlación de Pearson. Las librerías son agrupadas entre ellas considerando el mayor coeficiente correlación. P: coeficiente de la correlación de Pearson. Color morado indica mayor correlación, color rosado pálido indica menor correlación. En la gráfica se muestran todas las réplicas experimentales (muestras biológicas por duplicado). Replica 1: “.1”; Replica 2: “.2”.

En la gráfica de figura 18 se puede apreciar claramente como hay una agrupación por tejido, por réplica y por tratamiento, lo cual indica una expresión diferenciada por tejido y por tratamiento, y valida la presencia de réplicas biológicas reales ya que la dispersión entre réplicas es baja teniendo en cuenta que hay autores que mencionan que un valor de  $R < 0.8$  entre replicas biológicas es aceptable para continuar con los análisis de expresión diferencial (Wang *et al.*, 2020).

El análisis de expresión diferencial mostró que en tejido de manto hay una mayor respuesta transcripcional por efecto de los tratamientos con CBADs, en comparación con la respuesta del tejido de branquia. En manto, los organismos tratados con T1 (3,933), T3 (3,648) y T4 (3,280) mostraron una mayor regulación de transcritos en comparación con los organismos tratados con T2 (1,912) y T5 (2,789). En branquia los organismos tratados con T2 (1,561) y T4 (1,744) mostraron una mayor regulación de transcritos, en comparación a los organismos tratados con T1 (1,125), T3 (1,409) y T5 (1,154) (Tabla IV).

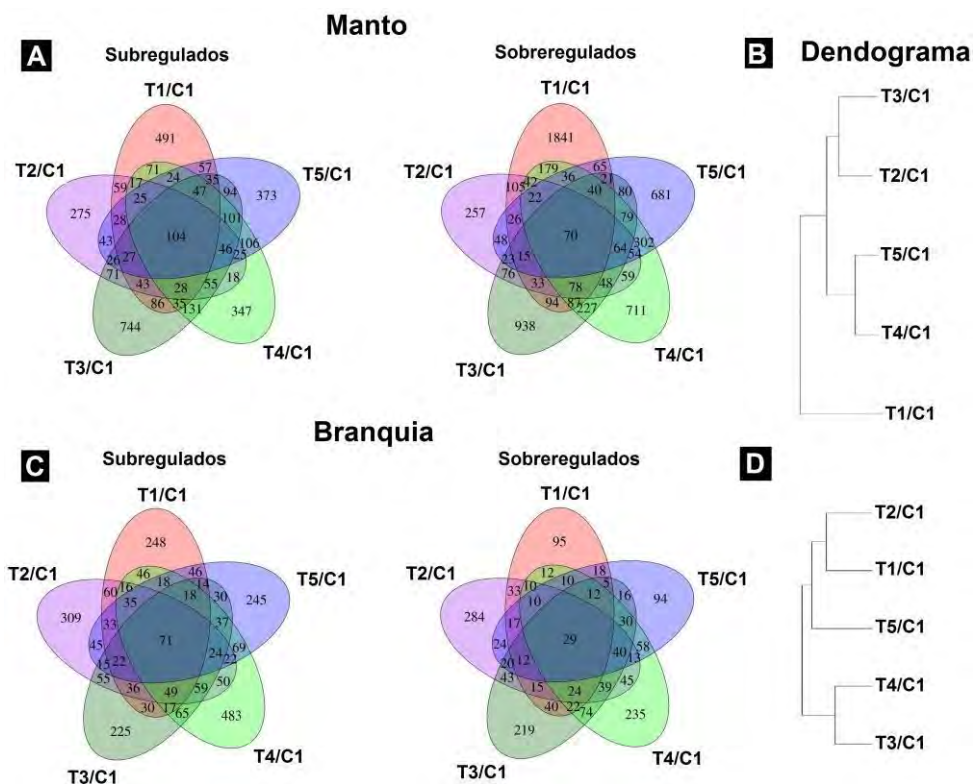
**Tabla IV.** Número de transcritos expresados diferencialmente comparando todas las condiciones experimentales en tejido de mano y branquia de juveniles de almeja Catarina *Argopecten ventricosus* tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) durante 21 días, considerando un FDR de 0.01. Sobre: transcritos sobre regulados diferencialmente, Sub: transcritos sub-regulados diferencialmente. T1: *V. parahaemolyticus* 1D + *V. alginolyticus* 1D, T2: *V. parahaemolyticus* 7C + *V. alginolyticus* 7C, T3: Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D, T4: *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C, T5: VidatoX<sup>®</sup> 31C, C1: Etanol C1.

Tratamiento	Sobre-	Sub-	Total
Manto T1/C1	2,755	1,178	3,933
Manto T2/C1	1,021	891	1,912
Manto T3/C1	1,974	1,674	3,648
Manto T4/C1	2,099	1,181	3,280
Manto T5/C1	1,627	1,162	2,789
Branquia T1/C1	365	760	1,125
Branquia T2/C1	659	902	1,561
Branquia T3/C1	641	768	1,409
Branquia T4/C1	664	1,080	1,744
Branquia T5C1	409	7,45	1,154

Los diagramas de Venn, que permiten observar el número de transcritos regulados por efecto específico del tratamiento, mostraron un claro efecto por acción del tratamiento

aplicado, ya que la mayoría de los transcritos regulados diferencialmente no se compartieron entre tratamientos (Fig. 19).

Los tratamientos que presentaron un mayor número de transcritos sobre-regulados en manto correspondieron a T1/C1 (1,841) y T3/C1 (938), mientras que el menor número de transcritos sobre-regulados se observó en T2/C1 (257) y T5/C1 (681). En cuanto al mayor número de transcritos sub-regulados en manto, destacaron los tratamientos T1/C1 (491) y T3/C1 (744), mientras que T2/C1 (275) y T4/C1 (347) registraron el menor número de transcritos sub-regulados (Fig. 19A).



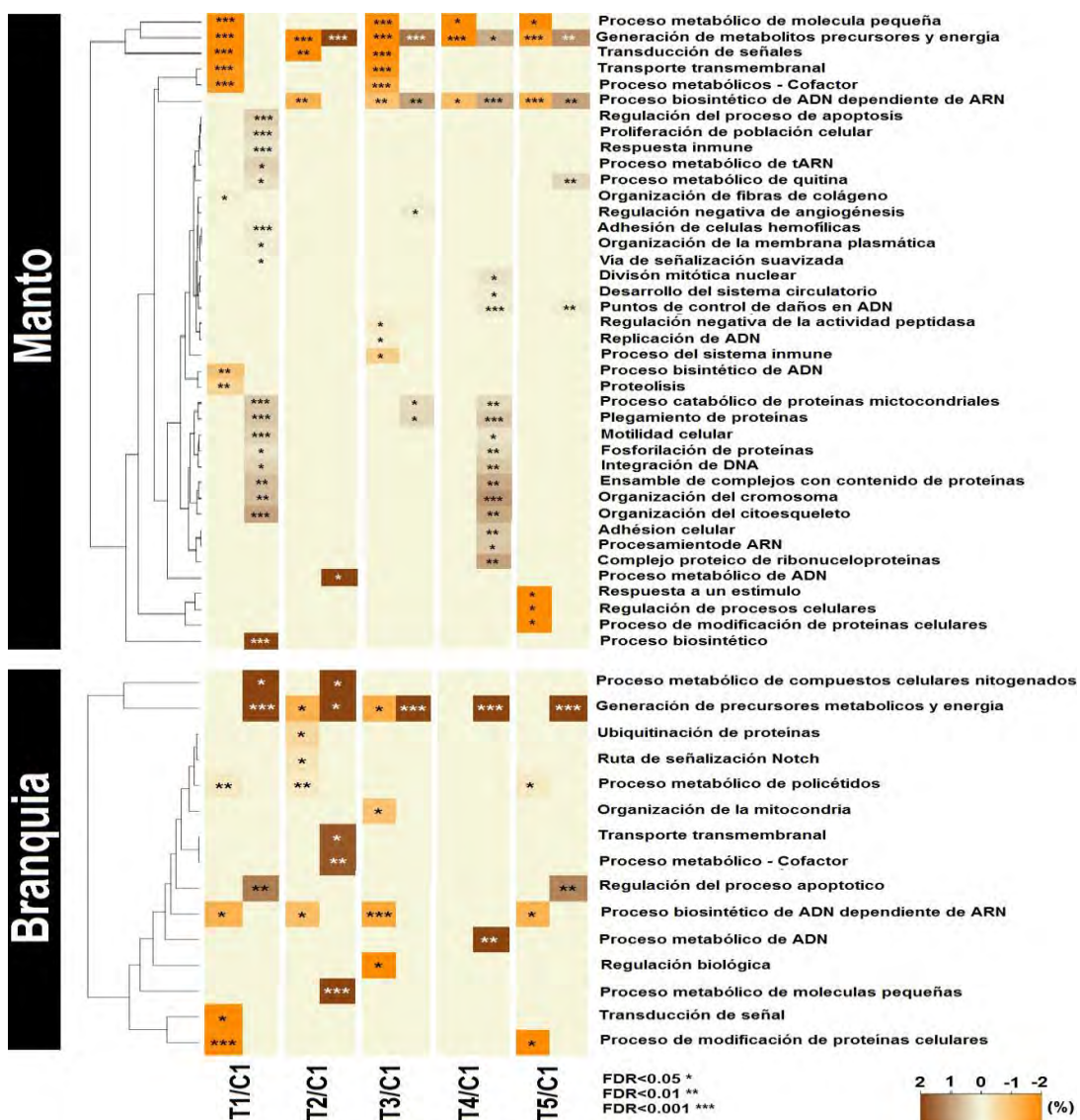
**Figura 19.** Diagramas de Venn utilizando transcritos sobre- y sub-regulados entre tratamientos y control C1 en tejido de (A) manto y (C) branquia de juveniles de almeja *Catarina Argopecten ventricosus* tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) durante 21 días. Los dendrogramas muestran la agrupación entre tratamientos comparando los transcritos expresados diferencialmente en (B) manto y (D) branquia. T1: *V. parahaemolyticus* 1D + *V. alginolyticus* 1D, T2: *V. parahaemolyticus* 7C + *V. alginolyticus* 7C, T3: Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D, T4: *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C, T5: VidatoX<sup>®</sup> 31C, C1: Etanol 1C.

En branquia, el mayor número de transcritos sobre-regulados se observó en los tratamientos T2/C1 (284) y T4/C1 (235) y el menor en T1/C1 (95) y T5/C1 (94). En cuanto al mayor número de transcritos sub-regulados en branquia, destacaron los tratamientos T2/C1 (309) y T4/C1 (483), mientras que el menor número de transcritos sub-regulados se observó en T3/C1 (225) y T5/C1 (245) (Fig. 19C).

La agrupación de los tratamientos según el perfil de expresión diferencial en manto registró una agrupación entre los tratamientos T3/C1 y T2/C1, y T5/C1 y T4/C1, mientras que en T1/C1 se registró un perfil de expresión completamente distinto a los demás tratamientos (Fig. 19B). En branquia, la agrupación de los tratamientos según el perfil de expresión fue diferente a manto, ya que la agrupación entre tratamientos estuvo acorde a los compuestos bioactivos utilizados, donde T1/C1, T2/C1 (formulados a partir de lisados bacterianos 1D y 7C) y T5/C1 (VidatoX<sup>®</sup> 31C) se agruparon en un clúster distinto a los tratamientos T3/C1 (formulado a partir de meta silicato de sodio y ácido fosfórico 1D) y T4/C1 (formulado a partir de *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C y *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C) (Fig. 19D).

### **7.6.3 Enriquecimiento de expresión diferencial de genes regulados por efecto de compuestos bioactivos altamente diluidos**

A partir del análisis de enriquecimiento y utilizando los términos GO de los transcritos regulados diferencialmente, se obtuvieron los procesos biológicos regulados por efecto de cada tratamiento evaluado. En tejido de manto, T1/C1 y T4/C1 mostraron una mayor sobre-regulación de procesos biológicos. Ambos tratamientos (T1/C1 y T4/C1) sobre-regularon procesos biológicos relacionados al catabolismo de proteínas en mitocondria, plegamiento de proteínas, motilidad celular, fosforilación de proteínas, integración de DNA, organización del cromosoma y organización del citoesqueleto (Fig. 20).



**Figura 20.** Enriquecimiento de procesos biológicos de las categorías de Gene Ontology (GO) basado en la expresión diferencial de genes regulados en manto y branquia de juveniles de almeja *Catarina Argopecten ventricosus* tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) durante 21 días. Color café muestra el porcentaje de genes inducidos y color naranja muestra el porcentaje de genes reprimidos que participan en el proceso biológico. La cantidad de asteriscos muestra el nivel de significancia. T1: *V. parahaemolyticus* 1D + *V. alginolyticus* 1D, T2: *V. parahaemolyticus* 7C + *V. alginolyticus* 7C, T3: Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D, T4: *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C, T5: VidatoX<sup>®</sup> 31C, C1: Etanol 1C.

Para el caso particular de T1/C1, se sobre-regularon procesos relacionados a respuesta inmune, proliferación de la población celular y regulación del proceso apoptótico. Para el caso de T4/C1, se observó la sobre-regulación de procesos relacionados a adhesión

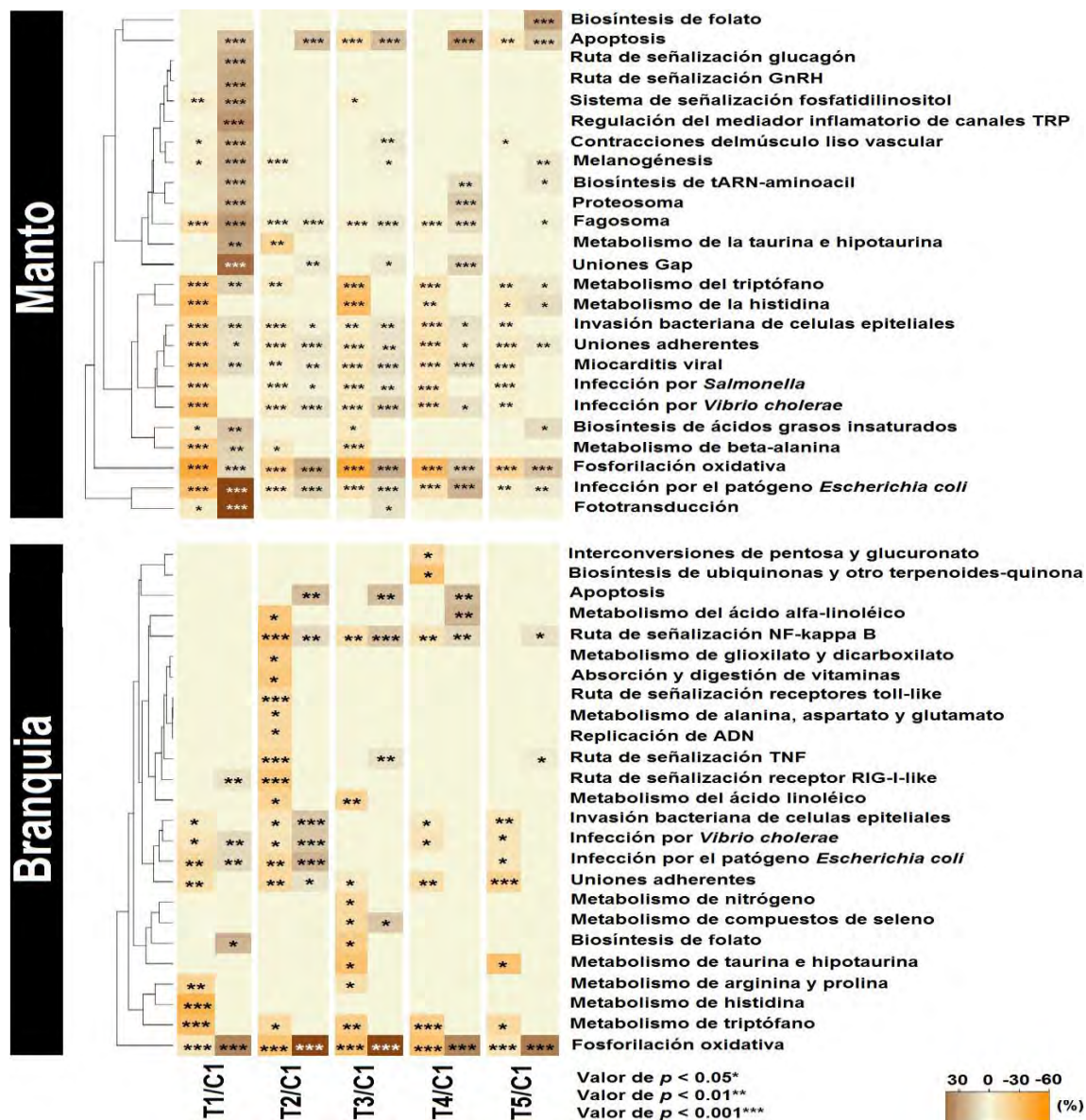


celular, procesamiento de RNA, desarrollo del sistema circulatorio y puntos de revisión de daño al DNA (Fig. 20).

Los tratamientos T1/C1 y T3/C1 presentaron el mayor número de procesos biológicos sub-regulados en manto, los cuales se encontraron relacionados a procesos metabólicos de moléculas pequeñas, transducción de señal, transporte transmembranal y cofactores de procesos metabólicos. En el caso particular de T3/C1, se observó una sub-regulación de genes relacionados a procesos del sistema inmune (Fig. 20).

En branquia, la mayor cantidad de procesos biológicos sobre- y sub- regulados se observó en los tratamientos T1/C1 y T2/C1. En ambos tratamientos (T1/C1 y T2/C1) se sobre-regularon procesos metabólicos de compuestos celulares nitrogenados y se sub-regularon procesos del metabolismo de policétidos y biosíntesis de DNA dependiente de RNA. En el caso particular de T1/C1, se sobre-regularon procesos apoptóticos y se sub-reguló la transducción de señales y proceso de modificación de proteínas celulares, mientras que en T2/C1 se sobre-reguló el proceso de transporte transmembranal, procesos metabólicos de cofactores y procesos metabólicos de moléculas pequeñas, y se sub-reguló el proceso de ubiquitinación de proteínas y la ruta de señalización notch (Fig. 20).

Por otra parte, el análisis de enriquecimiento de los términos KO de los transcritos regulados diferencialmente, mostró las rutas metabólicas reguladas por efecto de cada tratamiento evaluado (Fig. 21).



**Figura 21.** Enriquecimiento de rutas metabólicas (KO) basado en la expresión diferencial de genes regulados en manto y branquia de juveniles de almeja Catarina *Argopecten ventricosus* tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) durante 21 días. Color café muestra el porcentaje de genes inducidos y color naranja muestra el porcentaje de genes reprimidos que participan en el proceso biológico. La cantidad de asteriscos muestra el nivel de significancia. T1: *V. parahaemolyticus* 1D + *V. alginolyticus* 1D, T2: *V. parahaemolyticus* 7C + *V. alginolyticus* 7C, T3: Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D, T4: *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C, T5: VidatoX<sup>®</sup> 31C, C1: Etanol 1C.

En manto, la mayoría de las rutas metabólicas sobre- y sub-reguladas se asociaron a la respuesta inmune (fosforilación oxidativa, infección causada por la cepa patógena



*Escherichia coli*, Infección por *Vibrio cholerae*, infección por *Salmonella*, miocarditis viral, uniones adherentes, invasión bacteriana en células epiteliales, metabolismo de triptófano, fagosoma y apoptosis), y fueron reguladas por la mayoría de los tratamientos. En manto, el tratamiento T1/C1 registró un mayor número de rutas metabólicas sobre- y sub- reguladas, de las cuales, algunas fueron sobre-reguladas solo por el efecto de este tratamiento (Ruta de señalización del glucagón, ruta de señalización de GnRH y mediador de inflamación regulado por los canales TRP). No hubo rutas sub-reguladas específicas del tratamiento T1/C1 (Fig. 21).

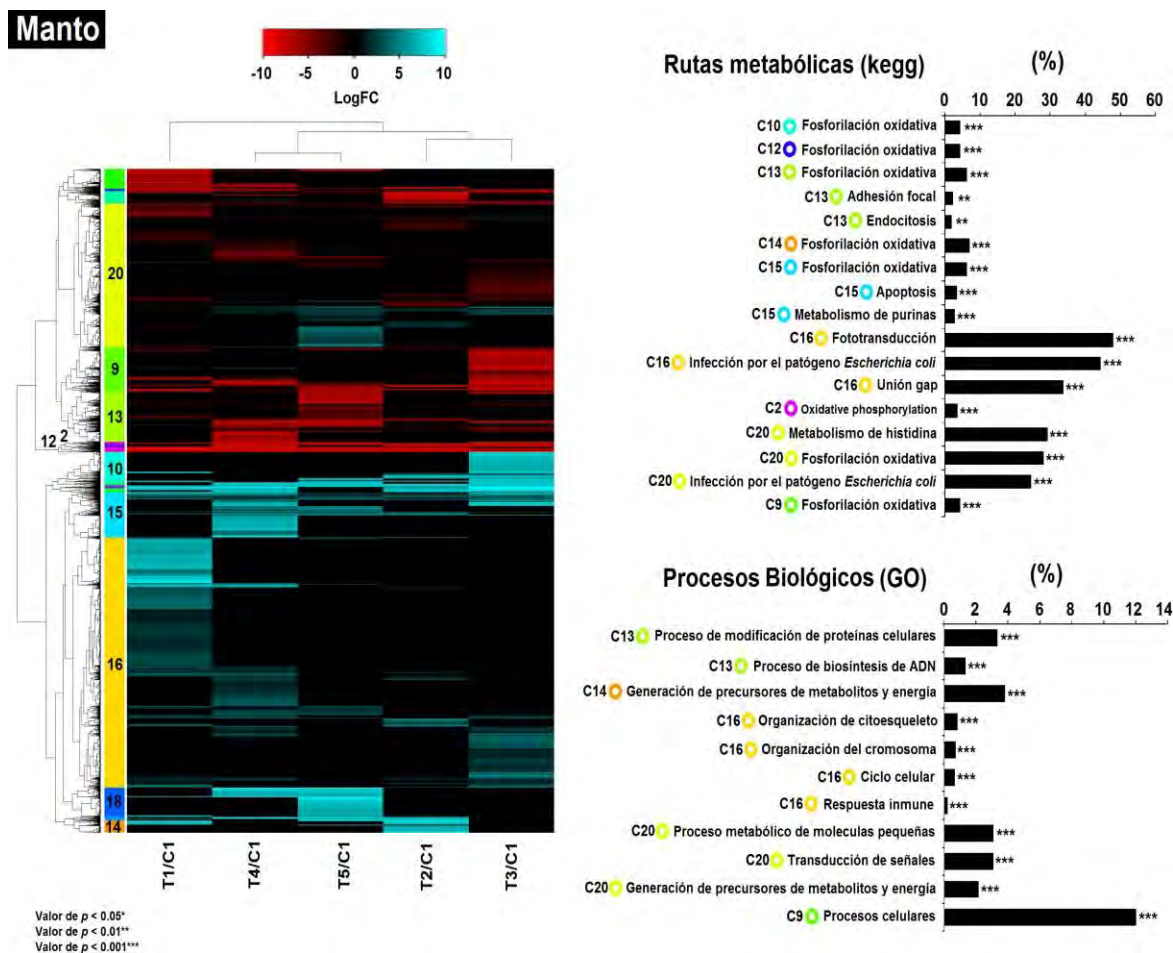
En el caso de branquia, se registró un menor número de rutas metabólicas reguladas por efecto de los tratamientos evaluados. La ruta de oxidación fosforilativa, metabolismo de triptófano y uniones adherentes, se reguló por efecto de todos los tratamientos y la ruta de señalización NF-kappa B, ampliamente ligada con la respuesta inmune, se reguló por efecto de la mayoría de los tratamientos, con excepción de T1/C1. En branquia, el tratamiento T2/C1 registró el mayor número de rutas metabólicas sobre- y sub- reguladas, siendo el único tratamiento en el cual se sobre-regularon las rutas asociadas a la invasión bacteriana de células epiteliales, uniones adherentes y biosíntesis de folato. En cuanto a las rutas metabólicas sub-reguladas solo por efecto del tratamiento T2/C1, podemos mencionar las rutas metabólicas de absorción y digestión de vitaminas, metabolismo de glyoxilato, ruta de señalización Toll-like, replicación de ADN, metabolismo de aminoácidos y metabolismo de ácido alfa linoleico (Fig. 21).

#### **7.6.4 Agrupamiento y enriquecimiento funcional de los transcritos expresados diferencialmente por efecto de compuestos bioactivos altamente diluidos**

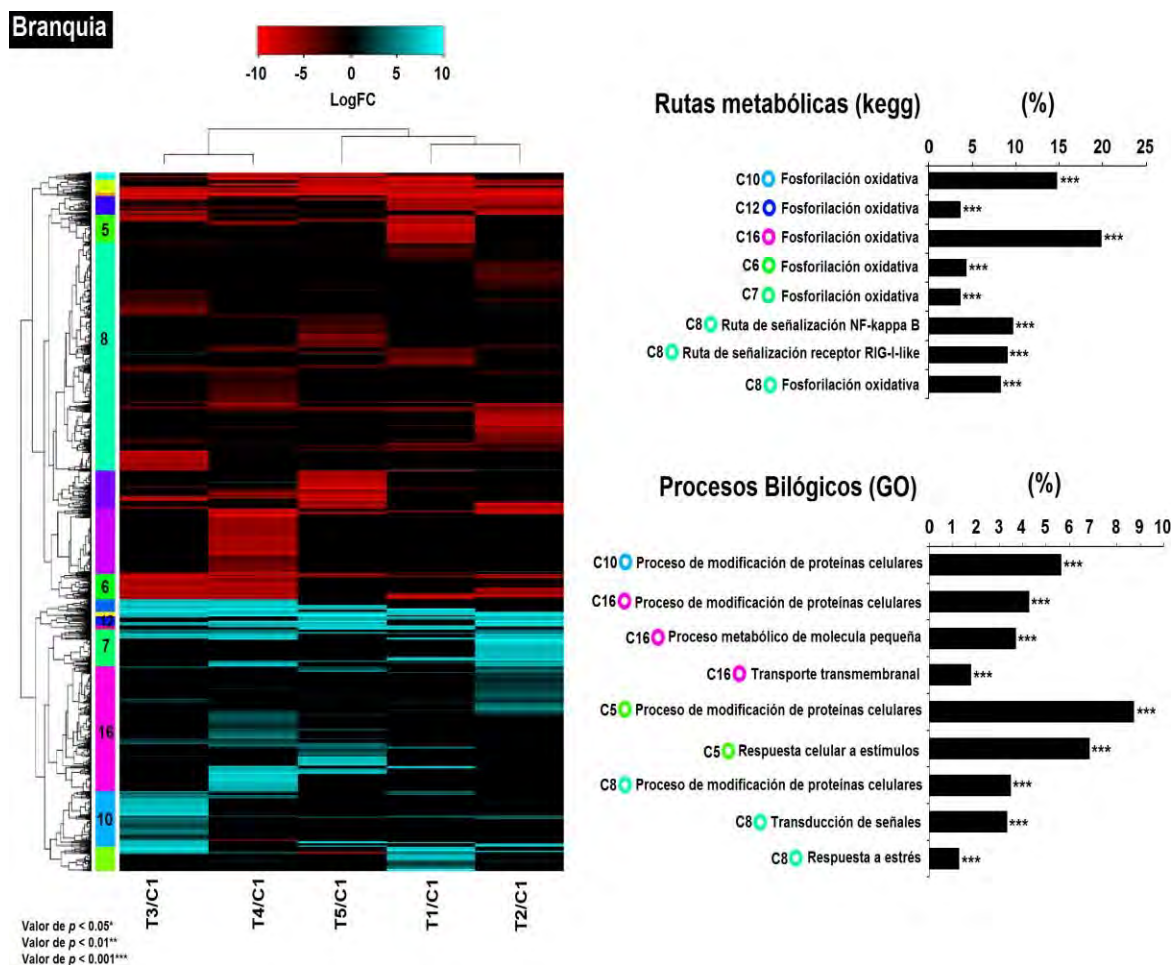
Con el fin de visualizar los transcritos con posible co-expresión en cada tejido y tratamiento, se llevó a cabo una agrupación jerárquica con base al  $\log_2$ Folds Change de los transcritos regulados diferencialmente (Fig. 22 y 23). Para cada grupo se realizó un análisis de enriquecimiento con términos GO y KO para asignar un proceso biológico o ruta metabólica, respectivamente. En manto se obtuvieron 20 grupos, de los cuales solo nueve presentaron un enriquecimiento con términos GO y/o KO. Producto de la selección de los primeros 3 procesos biológicos y rutas metabólicas con mayor porcentaje de genes involucrados, se registraron cinco grupos (C2, C9, C10, C12, C14)

enriquecidos con procesos biológicos relacionados a fosforilación oxidativa, y cuatro (C13, C15, C16, C20) a procesos relacionados a la respuesta inmune (Fig. 22). En el grupo C13 se registraron cinco transcritos relacionados a adhesión focal y cinco relacionados a endocitosis. La mayoría de los transcritos fueron sub-regulados en C13 principalmente por efecto de T5/C1 (Fig. 24). Un total de cinco transcritos del grupo C15 se relacionaron al proceso de apoptosis (Fig. 22). La mayoría de los transcritos en C15 registraron una sobre-regulación, principalmente en T4/C1 (Fig. 24). El grupo 16 registró 44 transcritos relacionados a procesos de infección causados por el patógeno *Escherichia coli*, 31 a organización de citoesqueleto y ocho a procesos relacionados con la respuesta inmune (Fig. 22). Todos los transcritos del grupo C16 fueron mayormente sobre-regulados principalmente por efecto de T1/C1 (Fig. 24). El grupo C20 se conformó de 65 transcritos relacionados a la transducción de señales y 18 a procesos de infección causados por el patógeno *Escherichia coli* (Fig. 22). En el grupo C20 la mayoría de los tratamientos presentaron transcritos sobre- y sub- regulados, registrando el mayor número de transcritos sobre-regulados en T5/C1 y el menor en T1/C1 y T3/C1 (Fig. 24).

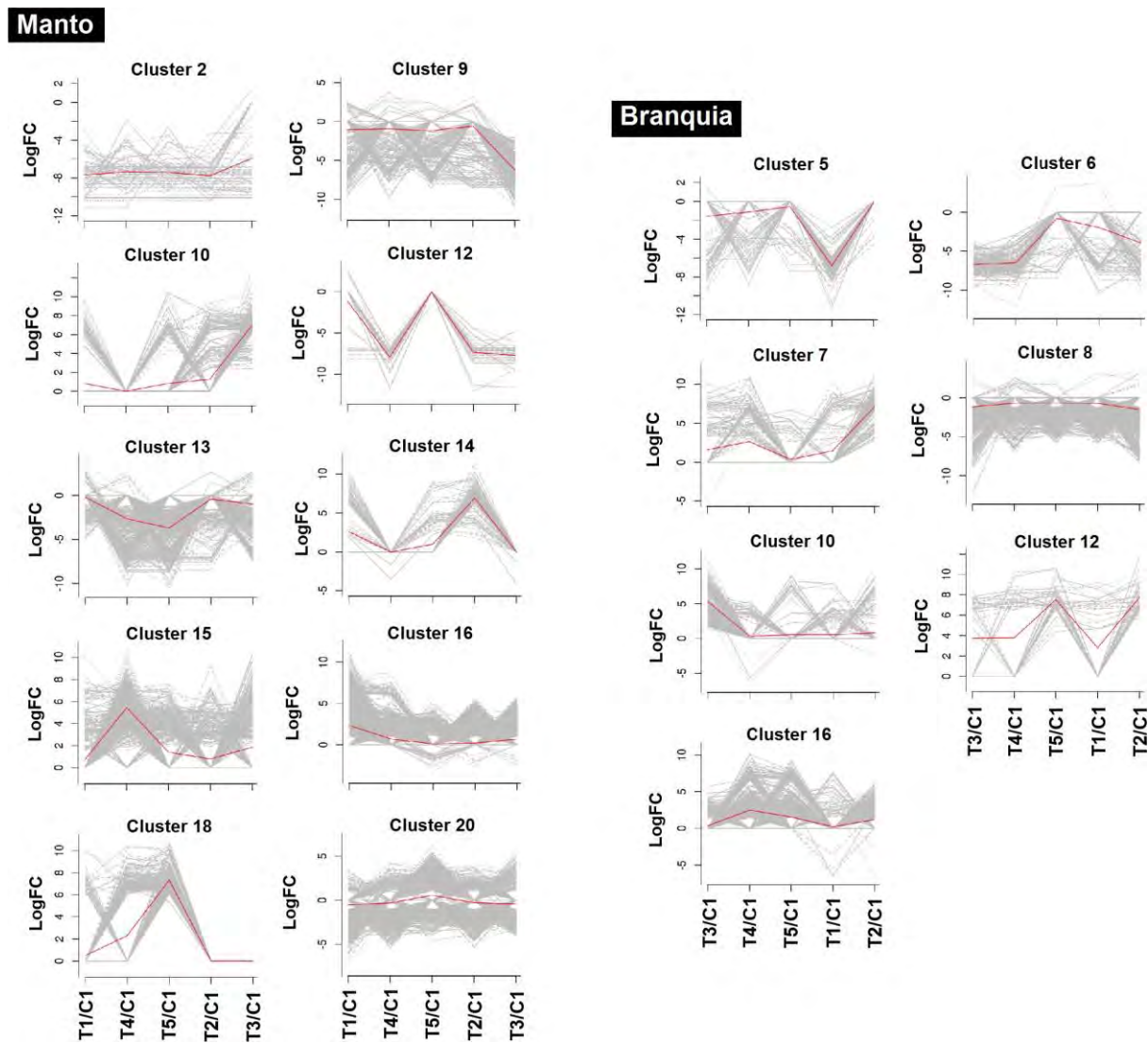
En la agrupación de los transcritos expresados diferencialmente en branquia se mostró la formación de un total de 17 grupos, de los cuales siete presentaron un enriquecimiento con términos GO y/o KO. Producto de la selección de los primeros 3 procesos biológicos y rutas metabólicas con mayor porcentaje de genes involucrados, se registraron seis grupos (C6, C7, C8, C10, C12, C16; grupos C6, C7, C12 solo se asociaron a fosforilación oxidativa) enriquecidos con procesos biológicos relacionados a fosforilación oxidativa y tres (C5, C8, C16) a procesos relacionados a la respuesta inmune (Fig. 23). En el grupo C5, 11 transcritos se relacionaron a la respuesta celular generada por un estímulo (Fig. 23). El grupo C5 registró un mayor número de transcritos sub-regulados, principalmente por efecto de T1/C1 (Fig. 24). Respecto al grupo C8, se registraron 10 transcritos relacionados a la ruta de señalización NF-kappa, 44 relacionados a transducción de señal y 17 a respuesta a estrés (Fig. 23). La mayoría de los transcritos del grupo C8 se sub-regularon, mayormente en T2/C1 (Fig. 24). Un total de 13 transcritos relacionados al grupo C16 se relacionaron al transporte transmembranal en el tejido de branquia (Fig. 23). La mayoría de los transcritos del grupo C16 se sobre regularon, principalmente en T4/C1 (Fig. 24).



**Figura 22.** Gráfica heatmap que muestra la agrupación jerárquica de la expresión diferencial de los transcritos en manto de juveniles de almeja Catarina *Argopecten ventricosus* tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) durante 21 días. La clave de colores ubicada en la parte superior muestra los valores de  $\text{Log}_2\text{FC}$  de los genes expresados diferencialmente ( $\text{FDR} < 0.01$ ), mostrando en color cyan genes sobre regulados y en color rojo genes sub regulados. Clústers graficados en cajas de colores muestran agrupación de genes con posible co-expresión. Dendrograma muestra relación entre la expresión diferencial de genes entre tratamientos por medio de una agrupación jerárquica. A lado derecho de muestran los clústers con enriquecimiento funcional (Top 3 de GO o KO) con más de 5 genes participando en el proceso biológico o ruta metabólica ( $C = \text{clúster}$ ). Barras negras indican el porcentaje de genes que participan en el proceso biológico o ruta metabólica correspondiente. Círculos de colores muestran el color del clúster correspondiente a la gráfica del heatmap. T1: *V. parahaemolyticus* 1D + *V. alginolyticus* 1D, T2: *V. parahaemolyticus* 7C + *V. alginolyticus* 7C, T3: Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D, T4: *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C, T5: VidatoX<sup>®</sup> 31C, C1: Etanol 1C.



**Figura 23.** Gráfica heatmap que muestra la agrupación jerárquica de la expresión diferencial de los transcritos en branquia de juveniles de almeja Catarina *Argopecten ventricosus* tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) durante 21 días. La clave de colores ubicada en la parte superior muestra los valores de  $\text{Log}_2\text{FC}$  de los genes expresados diferencialmente ( $\text{FDR} < 0.01$ ), mostrando en color cyan genes sobre regulados y en color rojo genes sub regulados. Clústers graficados en cajas de colores muestran agrupación de genes con posible co-expresión. Dendrograma muestra relación entre la expresión diferencial de genes entre tratamientos por medio de una agrupación jerárquica. A lado derecho se muestran los clústers con enriquecimiento funcional (Top 3 de GO o KO) con más de 5 genes participando en el proceso biológico o ruta metabólica ( $C$ =clúster). Barras negras indican el porcentaje de genes que participan en el proceso biológico o ruta metabólica correspondiente. Círculos de colores muestran el color del clúster correspondiente a la gráfica del heatmap. T1: *V. parahaemolyticus* 1D + *V. alginolyticus* 1D, T2: *V. parahaemolyticus* 7C + *V. alginolyticus* 7C, T3: Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D, T4: *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C, T5: VidatoX<sup>®</sup> 31C, C1: Etanol 1C.



**Figura 24.** Patrones de expresión de clústers en manto y branquia con enriquecimiento funcional utilizando la base de datos Gene Ontology (GO) y Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KO). Transcritos regulados por efecto de compuestos bioactivos altamente diluidos e involucrados en procesos biológicos o rutas metabólicas enriquecidas se graficaron en líneas de color gris. Línea color rojo expresa el comportamiento promedio de los datos.

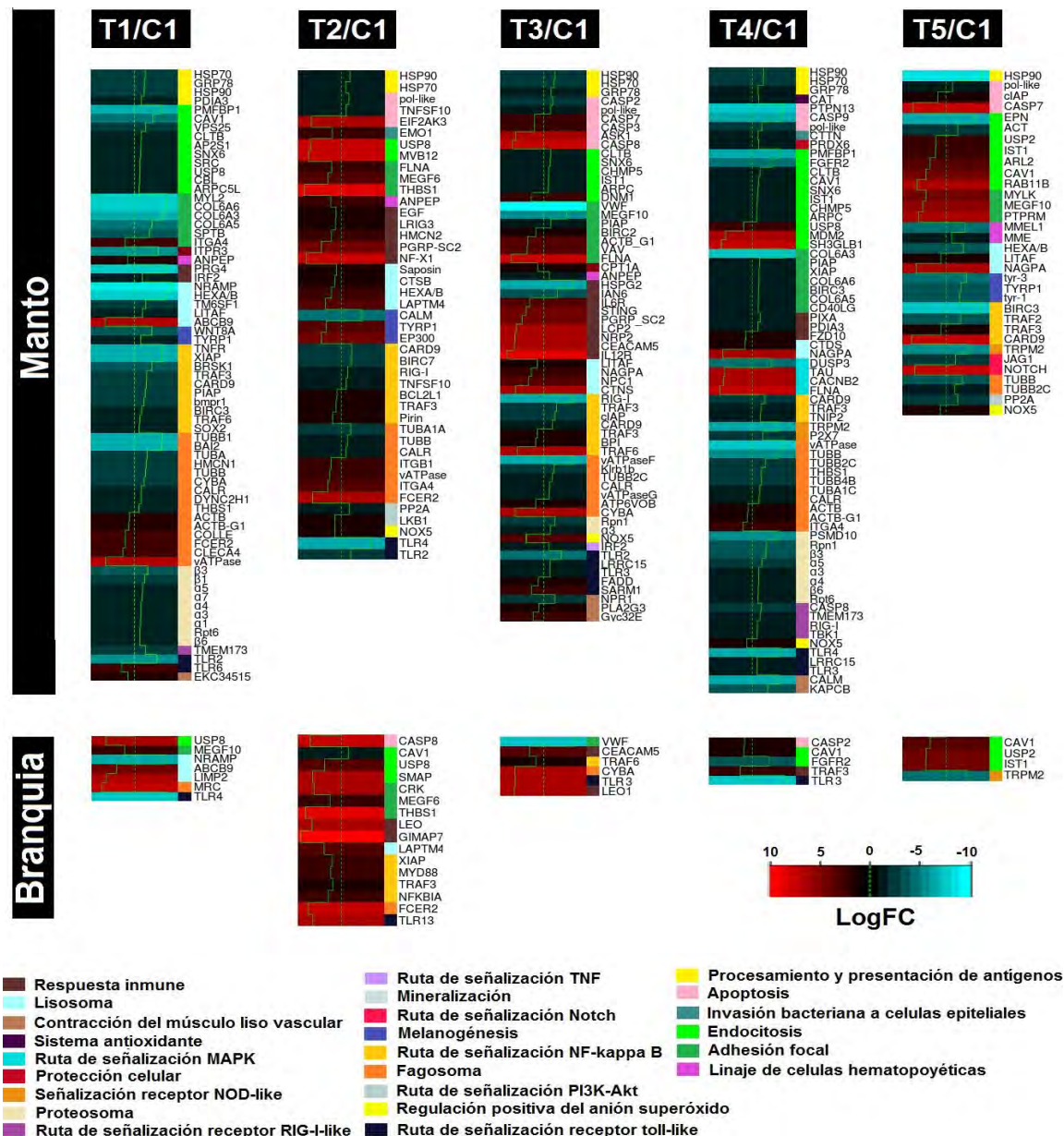
### 7.6.5 Transcritos expresados diferencialmente asociados a la respuesta inmune.

Debido a que los CBADs han demostrado mejorar la habilidad de los organismos marinos para sobre llevar procesos de infección (Mazón-Suástegui *et al.*, 2017), probablemente mediante la modulación del sistema inmune (Ortíz-Cornejo *et al.*, 2017), los transcritos regulados significativamente en el análisis transcriptómico y asociados al sistema inmune de *A. ventricosus* fueron identificados y analizados.

Basados en la anotación funcional y la categorización funcional de GO y KO, se identificaron un total de 193 transcritos relacionados a receptores del reconocimiento de lo no-propio, procesos de internalización y mecanismos asociados a la respuesta inmune. El análisis transcriptómico mostró que el mayor número de transcritos regulados de interés se registraron en manto (180) comparado a branquia (32) (Fig. 25). Las rutas metabólicas con mayor número de transcritos regulados por efecto de los CBADs están relacionadas con el fagosoma, endocitosis, endocitosis y ruta de señalización NF-kappa B. Cabe señalar que se detectaron transcritos relacionados a receptores del reconocimiento de moléculas de lo no-propio (Fig. 25).

En manto, el mayor número de transcritos regulados y relacionados a la respuesta inmune se registraron en organismos del tratamiento T1/C1 (sobre: 58, sub: 11) y T4/C1 (sobre: 56, sub: 13) y el menor en T5/C1 (sobre: 17, sub: 16). Los análisis funcionales mostraron que las rutas metabólicas con un mayor número de transcritos sobre-regulados en T1/C1, en tejido de manto, se asociaron a la ruta de señalización NF-kappa B (10), fagosoma (9) y endocitosis (10).





**Figura 25.** Heatmap que muestra la expresión diferencial de transcritos asociados a la respuesta inmune en branquia y manto de juveniles de almeja *Catarina Argopecten ventricosus* tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs). Los genes expresados diferencialmente se agruparon por categorías de rutas metabólicas en las cuales participan. En color cyan se observan genes sobre regulados y en color rojo genes sub regulados. T1: *V. parahaemolyticus* 1D + *V. alginolyticus* 1D, T2: *V. parahaemolyticus* 7C + *V. alginolyticus* 7C, T3: Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D, T4: *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C, T5: VidatoX<sup>®</sup> 31C, C1: Etanol 1C.

Cabe destacar que en T1/C1 también se sobre-regularon transcritos asociados al lisosoma (4), receptores de la familia toll-like (2) y proteínas de choque térmico (2), pero

en menor proporción. La mayoría de las rutas metabólicas sub-reguladas en manto de organismos de T1/C1 se relacionaron al fagosoma (6), ruta que también mostró transcritos sobre-regulados. Por su parte, en T4/C1 se observó la mayor sobre-regulación de transcritos asociados a endocitosis (8), adhesión focal (7) y fagosoma (7). El mayor número de transcritos sub-regulados en T4/C1 se asoció al sistema de señalización MAPK (4). En el manto de organismos tratados con T5/C1, la mayor cantidad de transcritos sobre-regulados se asoció a linajes celulares hematopoyéticos (2) y melanogénesis (3), mientras que el mayor número de transcritos sub-regulados se asoció a adhesión focal (3) y endocitosis (5) (Fig. 25, Anexo 1).

En branquia, la mayoría de los transcritos fueron sub-regulados por efecto de los CBADs; el tratamiento con el mayor número de transcritos sub-regulados fue T2/C1 (15) y el menor T5/C1 (3). Las rutas metabólicas con mayor número de transcritos sub-regulados en T2/C1 correspondieron a la ruta de señalización NF-kappa B (4) y endocitosis (2). El tejido de branquia de los organismos tratados con T2/C1 sobre-regularon solo un transcrito y estuvo asociado a endocitosis. Por último, las rutas metabólicas con mayor número de transcritos sobre-regulados en branquia de organismos tratados con T5/C1, correspondió a la señalización del receptor NOD-like (1) (Fig. 25, Anexo 1).

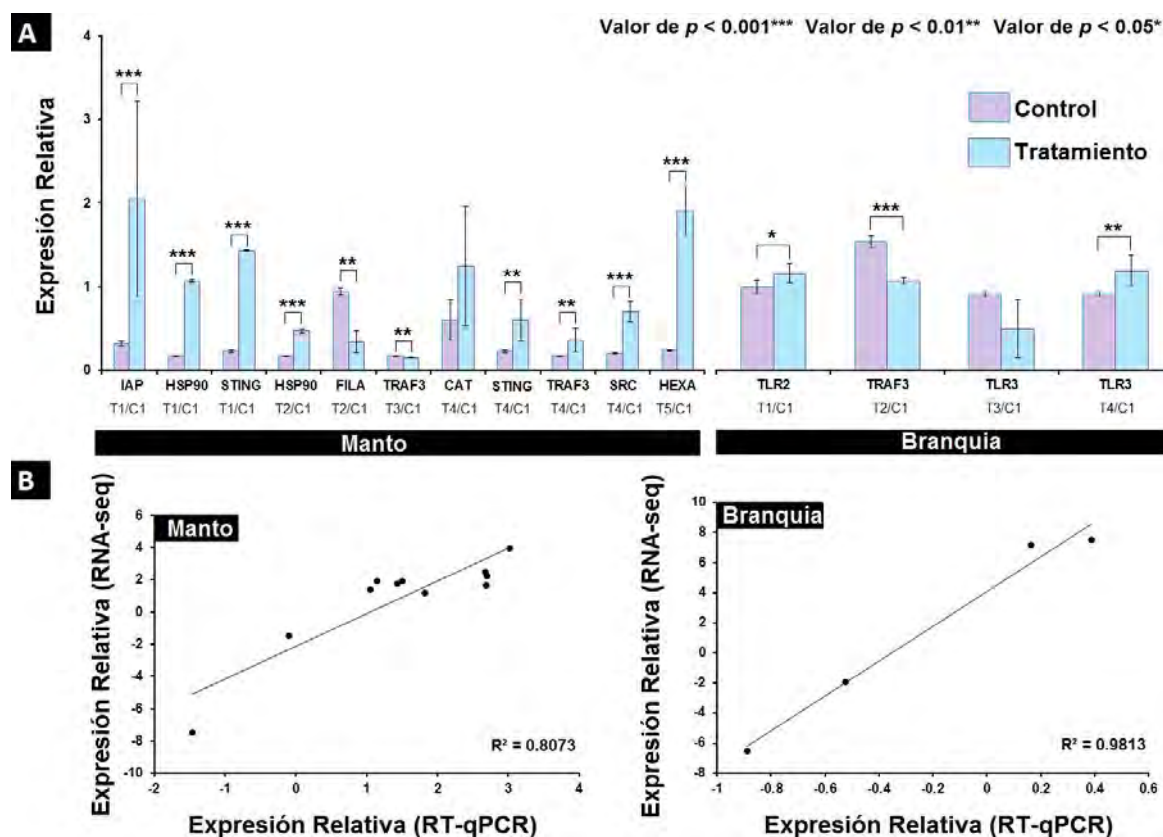
## **7.7 Validación por RT-qPCR**

### **7.7.1 Validación de los datos obtenidos por RNA-Seq mediante su correlación con los datos obtenidos en el análisis RT-qPCR**

Mediante análisis de RT-qPCR se evaluaron diez genes relacionados a la respuesta inmune, expresados diferencialmente por efecto de los cinco tratamientos formulados con CBADs. Todos los contrastes se llevaron a cabo utilizando el control C1 (Etanol 1C) como referencia. La expresión relativa en manto fue normalizada con la abundancia del gen de la subunidad alfa-like de la ATPasa transportadora de sodio/potasio y en branquia con el gen de la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de cAMP. Los análisis de RT-qPCR validaron los resultados observados en el análisis transcriptómico ya que se encontraron los mismos patrones de expresión. Los genes



IAP ( $P = 0.001$ ), HSP90 ( $P < 0.00001$ ) y STING ( $P = 0.002$ ) se sobre-regularon en el manto de organismos tratados con T1. En T2 el gen HSP90 fue sobre-regulado en ( $P < 0.00001$ ) tejido de manto y el gen FILA sub-regulado ( $P = 0.003$ ). El gen TRAF3 ( $P = 0.007$ ) se sobre-reguló en el manto de organismos tratados con T3. Los genes STING ( $P = 0.002$ ), TRAF3 ( $P = 0.007$ ) y SRC ( $P < 0.00001$ ) se sobre-regularon en el manto de organismos tratados con T4, y en T5 se registró la sobre-regulación del gen HEXA ( $P < 0.00001$ ) (Fig. 26A). En branquia, T1 sobre-reguló el gen TLR2 ( $P = 0.03$ ); T2 promovió la sobre-regulación del gen TRAF3 ( $P < 0.00001$ ) y T4 sobre-reguló la expresión de TLR3 ( $P = 0.01$ ) (Fig. 26A). Por último, la correlación entre la expresión de genes en manto y branquia, utilizando el valor de Log2FC de los datos entre el análisis RNA-Seq y RT-qPCR, mostró una correlación del 0.8 para el tejido de branquia y 0.94 para el tejido de branquia (Fig. 26B).



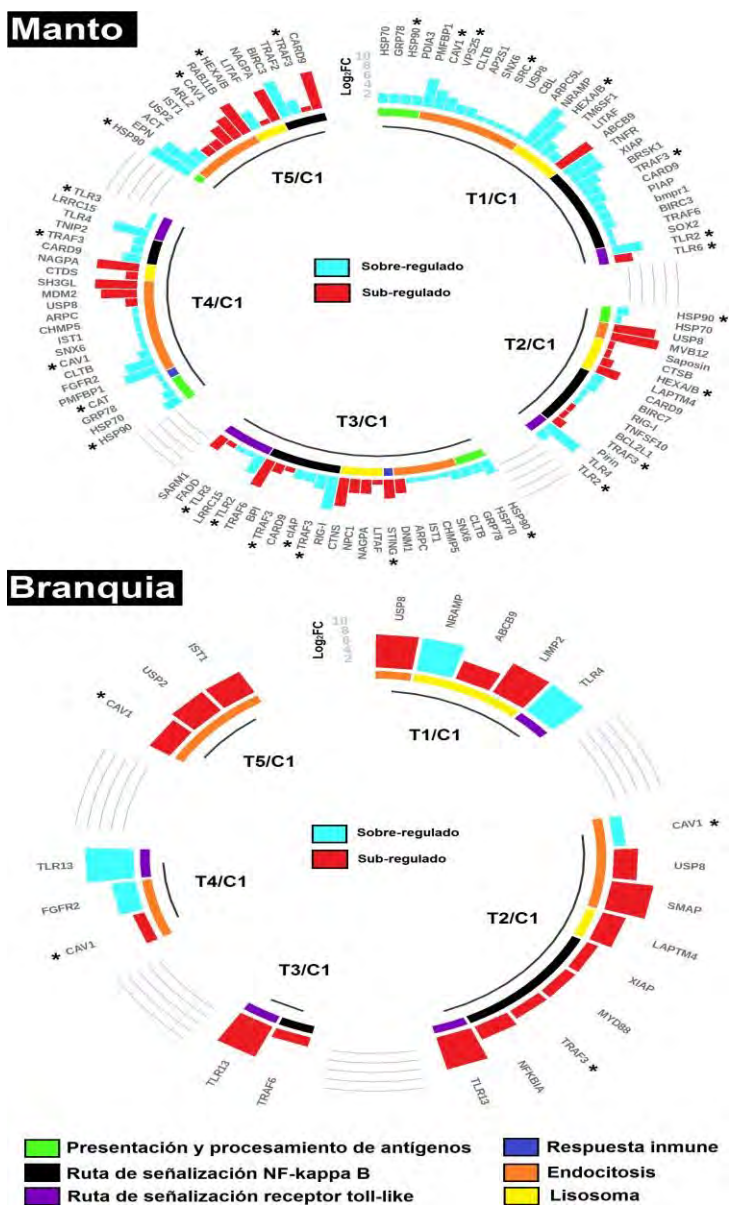
**Figura 26.** A) Validación del transcriptoma utilizando RT-qPCR seleccionando genes expresados diferencialmente en el análisis transcriptómico de juveniles almeja Catarina *Argopecten ventricosus* tratados compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) durante 21 días. B) Regresión lineal entre genes expresados diferencialmente utilizando

el valor de Log2FC obtenido en el análisis transcriptómico (RNA-Seq) y RT-qPCR en manto y branquia. T1: *V. parahaemolyticus* 1D + *V. alginolyticus* 1D, T2: *V. parahaemolyticus* 7C + *V. alginolyticus* 7C, T3: Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D, T4: *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C, T5: VidatoX<sup>®</sup> 31C, C1: Etanol 1C. Los asteriscos (\*) muestran diferencias significativas entre control y tratamiento de cada gen (Prueba t de student independiente P<0.05).

### **7.7.2 Validación de rutas metabólicas y procesos biológicos regulados por efecto de compuestos bioactivos altamente diluidos utilizando RT-qPCR.**

Para la validación por RT-qPCR de procesos regulados por efecto de CBADs obtenidos del análisis transcriptómico (reconocimiento de lo no-propio, internalización de moléculas y respuesta inmune), se seleccionaron 14 genes involucrados en 6 rutas metabólicas de interés: presentación y procesamiento de antígenos (HSP90), ruta de señalización NF-kappa B (TRAF3, IAP), ruta de señalización del receptor toll-like (TLR2, TLR3, TLR6), respuesta inmune (STING, CAT, FILA), endocitosis (CAV1, VPS25, SRC) y lisosoma (HEXA) (Fig. 27). Adicionalmente se tomó el gen CYT, debido a que la ruta metabólica de fosforilación oxidativa estuvo regulada por efecto de todos los tratamientos.

Principalmente en branquia, los genes evaluados por RT-qPCR tuvieron una regulación por efecto del etanol dinamizado 1C (control C1) y del etanol diluido 1:100 (control C2). Debido a lo anterior, se consideró un cambio en la sobre- o sub- regulación de los genes evaluados solo cuando los tratamientos T1, T2, T4 y T5 (CBAD + etanol dinamizado 1C), presentaron diferencias estadísticas respecto a los tres controles (C1, C2 y C3). Como el tratamiento T3 fue formulado sin alcohol, este tratamiento se comparó solo con el control C3 (sin CBAD y sin Etanol).



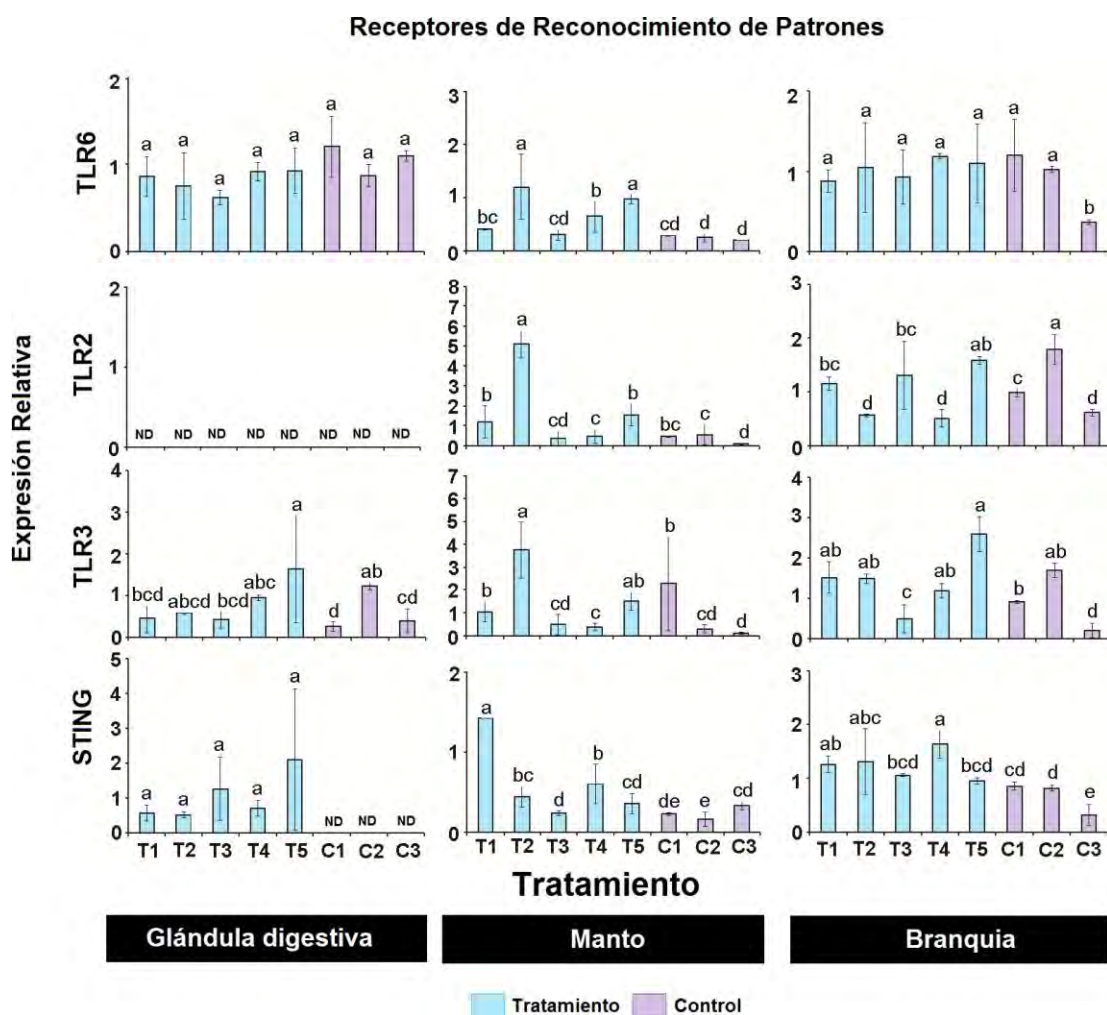
**Figura 27.** Rutas metabólicas asociadas a respuesta inmune reguladas por efecto de los compuestos bioactivos altamente diluidos en juveniles de almeja Catarina *Argopecten ventricosus*, y seleccionadas para su validación por RT-qPCR. En color cian se observan los transcritos sobre-regulados y en rojo los transcritos sub-regulados. Asterisco (\*) muestra genes seleccionados para la validación de la ruta metabólica. Los genes expresados diferencialmente se agruparon por categorías de rutas metabólicas en las cuales participan. T1: *V. parahaemolyticus* 1D + *V. alginolyticus* 1D, T2: *V. parahaemolyticus* 7C + *V. alginolyticus* 7C, T3: Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D, T4: *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C, T5: VidatoX<sup>®</sup> 31C, C1: Etanol 1C.

### 7.7.2.1. Genes asociados al sistema de reconocimiento de lo no-propio evaluados por RT-qPCR.

En total, cuatro receptores (STING, TLR2, TLR6 y TLR3) asociados a mecanismos del reconocimiento de lo no-propio fueron regulados por efecto de los CBADs. STING – un gen que codifica para un receptor intracelular capaz de detectar vita- PAMPs –, fue el receptor mayormente regulado por efecto de los CBADs y se detectó en todos los tejidos evaluados. En glándula digestiva, todos los tratamientos sobre-regularon STING, ya que no fue detectado en los controles. En manto, fue sobre-regulado ( $P < 0.00001$ ) por efecto de los tratamientos T1 y T4 en comparación a todos los controles, y en branquia, se sobre-reguló ( $P < 0.00001$ ) por efecto de T1 y T4 en comparación a todos los tratamientos y T3 en comparación a C3 (Fig. 28).

Los otros tres receptores regulados por efecto de los CBADs pertenecen a la familia toll-like, todos ellos asociados a la activación de la respuesta inmune y a la detección de PAMPs y DAMPs. Particularmente, TLR2 y TLR6 son receptores extracelulares mientras TLR3 es un receptor intracelular. TLR2 fue solo detectado en tejido de manto y branquia. En manto, fue sobre-regulado ( $P < 0.00001$ ) por efecto de T2 en comparación a los demás controles, mientras que en branquia, fue sobre-regulado ( $P < 0.00001$ ) por T3 comparado con C3 (Fig. 28).

La regulación de TLR6 se detectó en todos los tejidos, pero solo se registraron diferencias significativas entre tratamientos y controles en tejido de manto y branquia. En manto, TLR6 fue sobre-regulado ( $P < 0.00001$ ) en organismos tratados con T2, T4 y T5 comparado contra todos los controles, y en branquia, fue sub-regulado ( $P = 0.001$ ) en los organismos tratados con T3 en comparación a los organismos tratados con C3. La expresión de TLR3 se observó en todos los tejidos; sin embargo, en glándula digestiva TLR3 no fue regulado por efecto de los tratamientos en comparación a los controles. En manto fue sobre-regulado ( $P < 0.00001$ ) por T2 en comparación a todos los controles y en branquia, fue sobre-regulado ( $P < 0.00001$ ) por el tratamiento T3 comparado con C3 (Fig. 28).



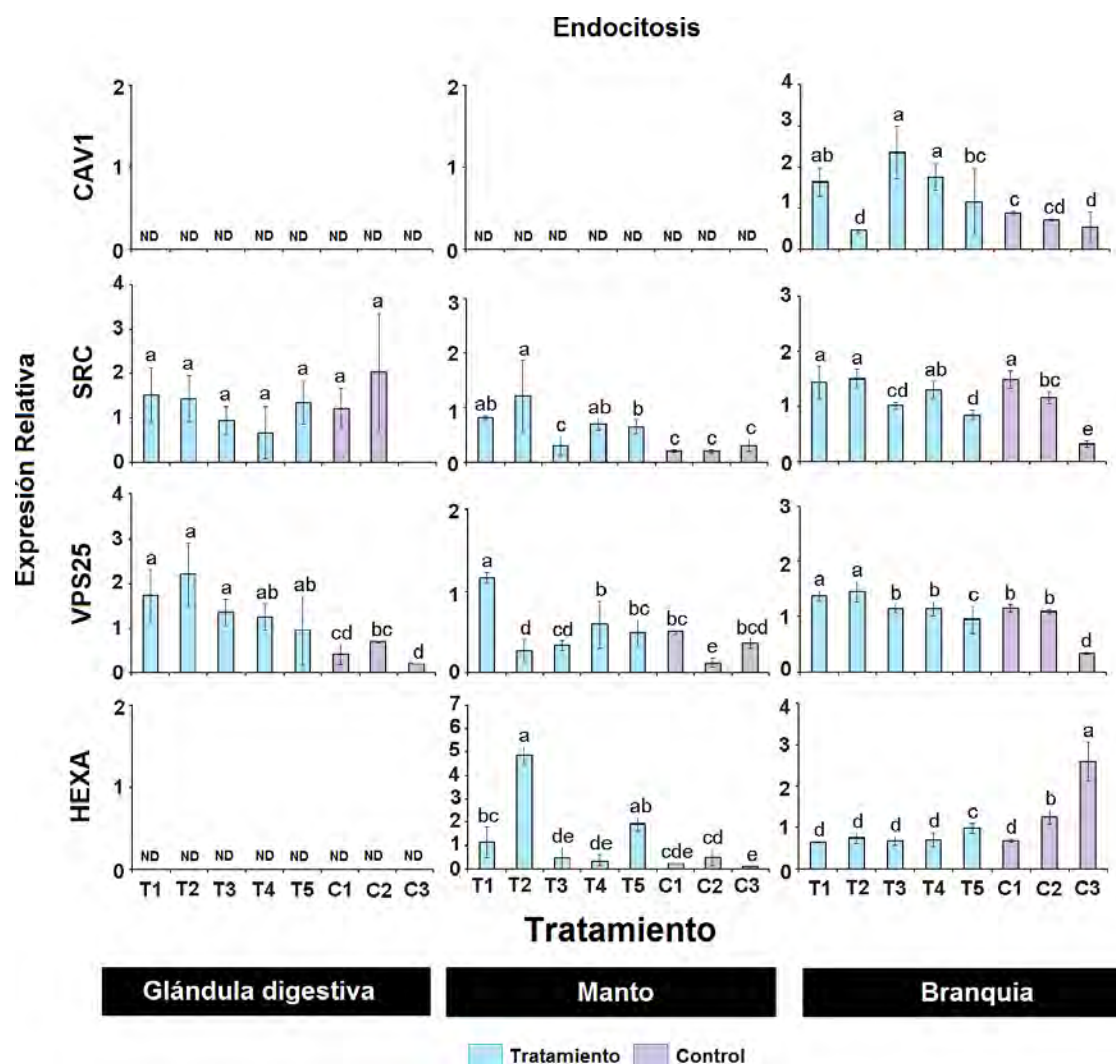
**Figura 28.** Expresión relativa de los genes TLR6, TLR2, TLR3 y STING en tejido de glándula digestiva, manto y branquia de juveniles de almeja *Argopecten ventricosus* tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) durante 21 días. Barras muestran promedio e intervalos de confianza al 95%. Letras diferentes muestran diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamiento. T1: *V. parahaemolyticus* 1D + *V. alginolyticus* 1D, T2: *V. parahaemolyticus* 7C + *V. alginolyticus* 7C, T3: Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D, T4: *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C, T5: VidatoX<sup>®</sup> 31C, C1: Etanol 1C, C2: Etanol 1:100, C3: Agua destilada. Las letras muestran diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA  $P < 0.05$ ).

### 7.7.2.2 Genes relacionados al proceso de internalización evaluados por RT-qPCR.

Un total de cuatro genes fueron evaluados (CAV1, SRC, VPS25 and HEXA) para validar diferentes etapas en el mecanismo de internalización celular de los CBADs. CAV1 (proceso de endocitosis *via* caveola) y SRC (proceso de endocitosis mediante el reacomodo del citoesqueleto de actina), se relacionaron a las primeras etapas de internalización, mientras que VPS25 (componente en la membrana endosomal) y HEXA



(enzima hidrolasa que puede ser encontrada en lisosomas), se relacionaron a etapas tardías del proceso de internalización celular. CAV1 solo fue detectado en branquia y fue sobre-regulado ( $P < 0.00001$ ) por los tratamientos T1, T3 y T4 en comparación a todos los controles, mientras SRC fue detectado en todos los tejidos, pero solo en manto y branquia se observaron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos y controles (Fig. 29).

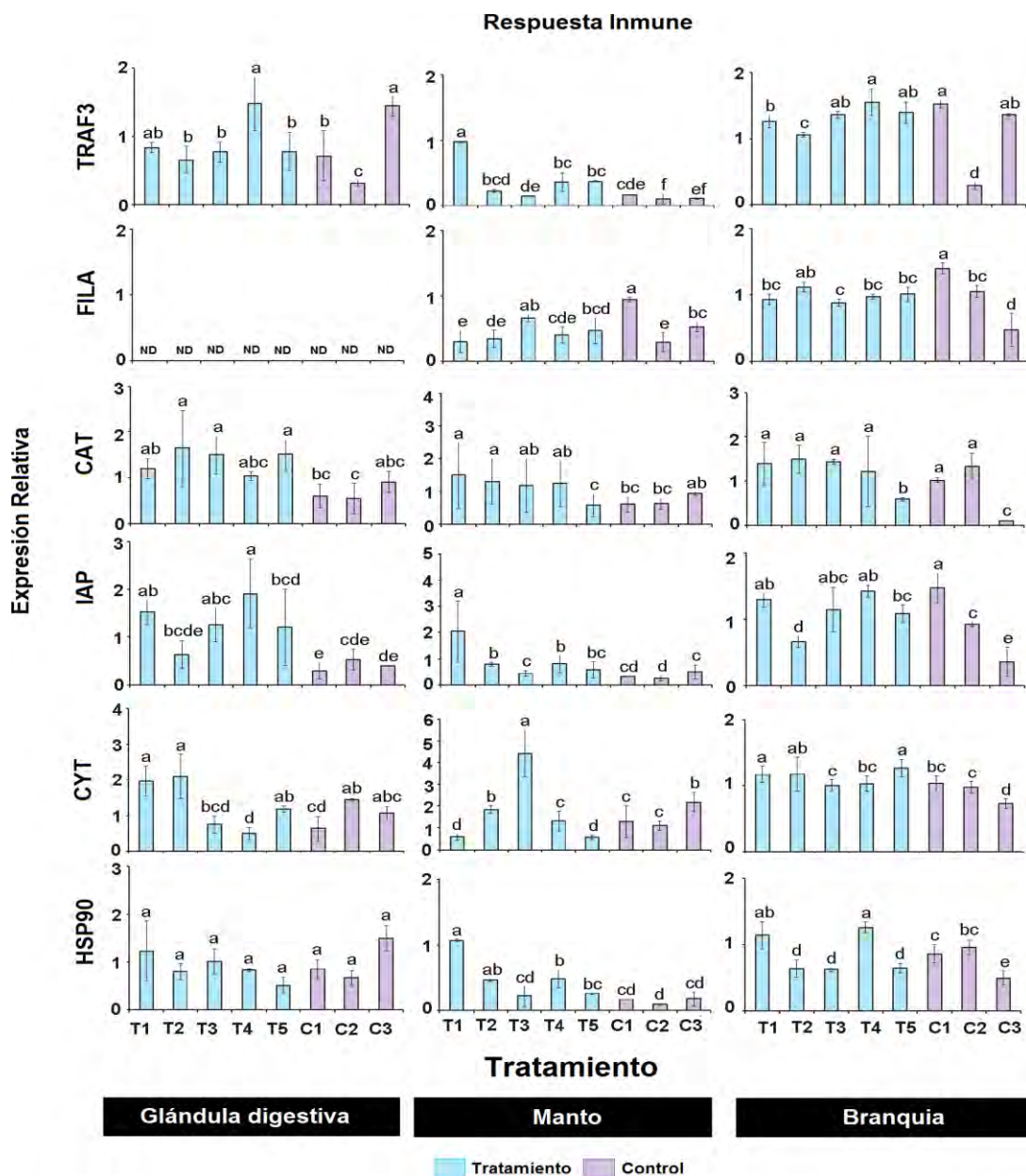


**Figura 29.** Expresión relativa de los genes CAV1, SRC, VPS25 y HEXA en tejido de glándula digestiva, manto y branquia de juveniles de almeja *Catarina Argopecten ventricosus* tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) durante 21 días. Barras muestran promedio e intervalos de confianza al 95%. Letras diferentes muestran diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamiento. T1: *V. parahaemolyticus* 1D + *V. alginolyticus* 1D, T2: *V. parahaemolyticus* 7C + *V. alginolyticus* 7C, T3: Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D, T4: *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C, T5: VidatoX<sup>®</sup> 31C, C1: Etanol 1C, C2: Etanol 1:100, C3: Agua destilada. Las letras muestran diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA  $P < 0.05$ ).

En manto, todos los tratamientos con excepción de T3, sobre-regularon ( $P < 0.00001$ ) el gen SRC en comparación a todos los controles, y en branquia, fue sobre-regulado ( $P < 0.00001$ ) por T3 en comparación a C3. La detección de VPS25 se registró en todos los tejidos. En glándula digestiva se sobre-reguló ( $P = 0.00006$ ) en los organismos tratados con T1 y T2 en comparación a todos los controles y T3, en comparación a C3. En manto, se sobre-reguló ( $P < 0.00001$ ) por efecto de T1 en comparación a todos los controles, y en branquia, fue sobre-regulado ( $P < 0.00001$ ) en organismos tratados con T1 y T2, comparados con todos los controles y con T3 comparado con C3. El gen HEXA solo fue detectado en tejido de manto y branquia. En manto, se sobre-reguló ( $P < 0.00001$ ) en los organismos tratados con T2 y T5 comparado con todos los controles, mientras que en branquia, se sub-reguló ( $P < 0.00001$ ) por T3 en comparación a C3 (Fig. 29).

### **7.7.2.3 Genes relacionados a la respuesta inmune evaluados por RT-qPCR**

Se evaluaron 6 genes (TRAF3, FILA, CAT, IAP, CYT y HSP90) expresados diferencialmente por efecto de los CBADs en el análisis transcriptómico y relacionados a la respuesta inmune. El gen TRAF3, -un mediador de la transducción de señales relacionado a la activación de la actividad antibacterial y antiviral-, fue sub-regulado ( $P = 0.004$ ) en la glándula digestiva de organismos tratados con T3 en comparación al control C3. En manto, se sobre-reguló ( $P < 0.00001$ ) en organismos tratados con T1 en comparación a todos los controles, mientras que en branquia no se observaron diferencias significativas entre tratamientos y controles (Fig. 30).



**Figura 30.** Expresión relativa de los genes TRAF3, FILA, CAT, IAP, CYT y HSP90 en tejido de glándula digestiva, manto y branquia de juveniles de almeja *Catarina Argopecten ventricosus* tratados con compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) durante 21 días. Barras muestran promedio e intervalos de confianza al 95%. Letras diferentes muestran diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamiento. T1: *V. parahaemolyticus* 1D + *V. alginolyticus* 1D, T2: *V. parahaemolyticus* 7C + *V. alginolyticus* 7C, T3: Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D, T4: *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C, T5: VidatoX<sup>®</sup> 31C, C1: Etanol 1C, C2: Etanol 1:100, C3: Agua destilada. Las letras muestran diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA  $P < 0.05$ ).



FILA, -un gen relacionado al movimiento celular mediado por la red del citoesqueleto y a la adhesión focal-, solo fue detectado en tejido de manto y branquia. En manto, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos y controles y en branquia se sobre-reguló ( $P < 0.00001$ ) en organismos tratados con T3, en comparación con los del grupo control C3 (Fig. 30).

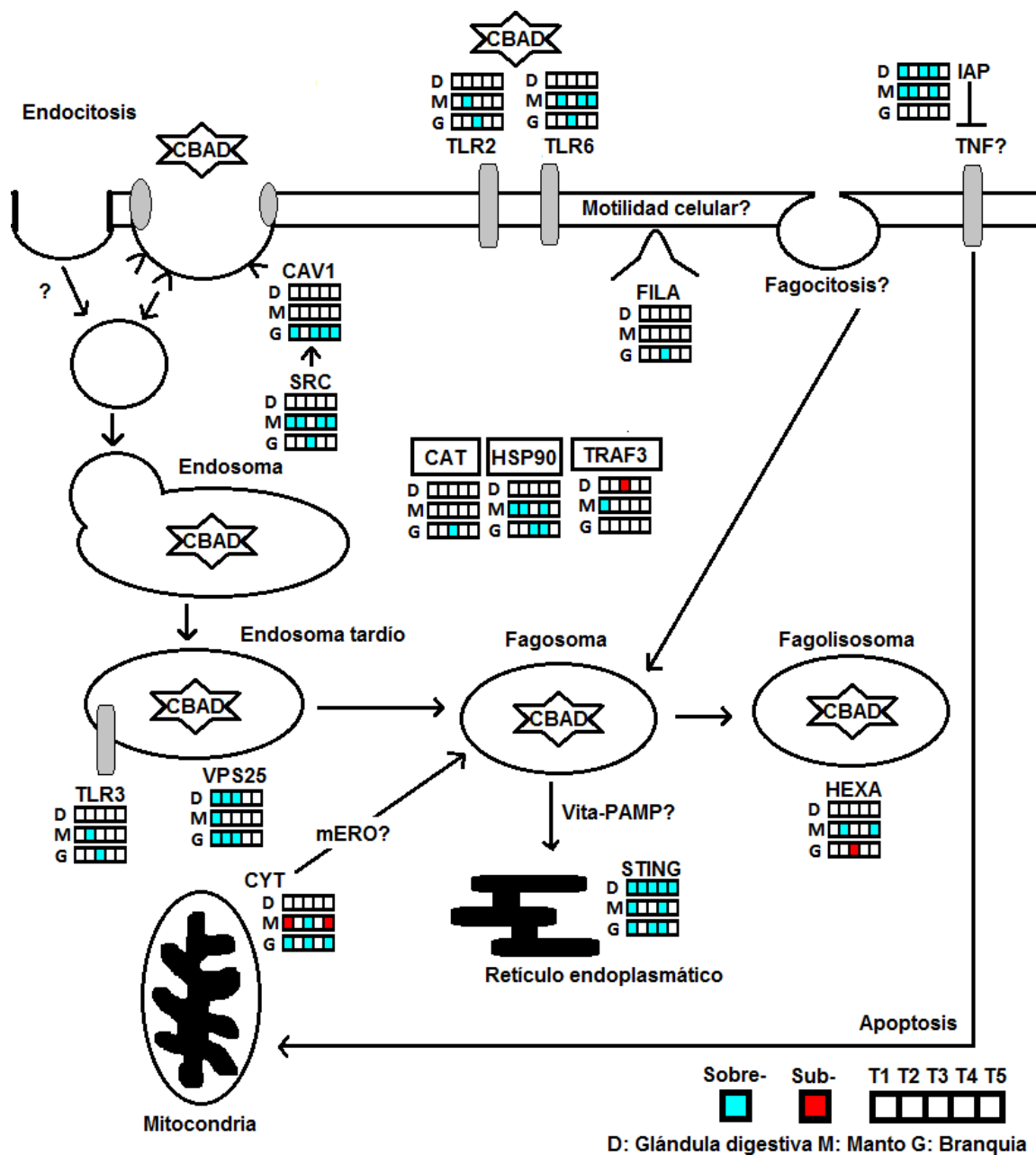
El tejido de glándula digestiva y manto de organismos tratados con CBADs no registraron diferencias en la regulación de CAT, -un gen que participa en el sistema antioxidante-, en comparación a los controles, mientras que en branquia se sobre-reguló ( $P < 0.00001$ ) por T3, en comparación de C3 (Fig. 30).

El gen IAP, -relacionado a mecanismos antiapoptóticos-, se detectó en todos los tejidos. En glándula digestiva, se sobre-reguló ( $P = 0.02$ ) por efecto de los tratamientos T1 y T4 en comparación a todos los controles, y de T3 en comparación a C3. En manto, fue sobre-regulado ( $P < 0.00001$ ) en organismos tratados con T1, T2 y T4 en comparación a todos los controles, mientras que en branquia se sobre-reguló ( $P < 0.00001$ ) por efecto de T3 en comparación a los organismos tratados con C3 (Fig. 30).

Al igual que IAP, CYT, -un gen relacionado al transporte de iones e implicado en la fosforilación oxidativa-, se registró en todos los tratamientos; sin embargo, en glándula digestiva no se observaron diferencias significativas entre tratamientos y controles. En manto, fue sobre-regulado ( $P < 0.00001$ ) en organismos tratados con T3 en comparación a aquellos tratados con C3, y sub-regulado en organismos tratados con T1 y T5 en comparación a todos los controles, mientras que en branquia, fue sobre-regulado ( $P < 0.00001$ ) en organismos tratados con T1 y T5 en comparación con todos los controles y en T3 en comparación con C3 (Fig. 30).

Por último, la regulación de HSP90, -un gen relacionado a la respuesta a estrés que codifica para un proteína chaperona-, solo registró diferencias significativas entre tratamientos y controles en los tejidos de manto y branquia. En manto, se sobre-reguló ( $P < 0.00001$ ) en organismos tratados con T1, T2 y T4 en comparación a todos los controles, mientras que en branquia, se sobre-reguló ( $P < 0.00001$ ) por efecto del tratamiento T4 en comparación a todas las condiciones experimentales y por T3 en comparación a C3 (Fig. 30).

Todos los resultados de expresión diferencial de genes se graficaron en un solo diagrama para facilitar su visualización y evidenciar su participación en los diversos mecanismos y procesos analizados (Fig. 31).



**Figura 31.** Rutas metabólicas hipotéticas reguladas en juveniles de almeja Catarina *Argopecten ventricosus* por efecto de compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs), validadas por RT-qPCR. T1: *V. parahaemolyticus* 1D + *V. alginolyticus* 1D, T2: *V. parahaemolyticus* 7C + *V. alginolyticus* 7C, T3: Metasilicato de sodio 1D + Ácido fosfórico 1D, T4: *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C, T5: VidatoX<sup>®</sup> 31C, C1: Etanol 1C, C2: Etanol 1:100, C3: Agua destilada. Cuadros rojos: genes sub-regulados; Cuadros ciano: genes sobre-regulados; D: glándula digestiva; M: manto; B: Branquia.

## 8. DISCUSIÓN

Como resultado de la presente investigación doctoral, se reporta por primera vez el transcriptoma de juveniles de almeja Catarina *A. ventricosus* (López-Carvallo et al. 2020), mismo que presenta niveles de fragmentación aceptables por tratarse de un ensamble “*de novo*” (Freedman et al., 2019). Sus estadísticas concuerdan con ensamblajes transcriptómicos de alta calidad desarrollados en otras especies modelo de moluscos bivalvos (Moreira et al., 2018; Dong et al., 2017; Ren et al., 2017; Ventoso et al., 2019; Ertl et al., 2016; Zhao et al., 2017). La obtención y análisis del transcriptoma nos permitió sustentar el hecho de que los juveniles de *A. ventricosus* tratados profilácticamente con CBADs son capaces de captar y reconocer los compuestos altamente diluidos, y de regular rutas metabólicas asociadas a la respuesta inmune. Este efecto se observó a nivel fisiológico (celular y humoral) y molecular, lo que corrobora la hipótesis de que los CBADs permiten incrementar la supervivencia de organismos marinos (Ortíz-Cornejo et al., 2017; Mazón-Suástegui et al., 2017; Mazón-Suástegui et al., 2018a, 2018b) debido a que estos compuestos actúan sobre mecanismos asociados al sistema de defensa. Por primera vez se sugiere que los CBADs permiten activar rutas metabólicas de la respuesta inmune asociadas al reconocimiento y eliminación de los compuestos altamente diluidos sin necesidad de activar otros mecanismos de defensa. El conocimiento alcanzado en la presente investigación permitirá desarrollar investigaciones en las que se incluyan retos contra patógenos y evaluar si la regulación de los mecanismos activados por los CBADs (reconocimiento de lo no-propio, endocitosis, citoprotección) permite a los organismos tratados profilácticamente sobrellevar procesos de infección causados por bacterias de alto grado de patogenicidad.

Los resultados obtenidos sugieren que los compuestos bioactivos altamente diluidos (CBADs) formulados a partir de bacterias patógenas, a las dos dinimizaciones evaluadas (T1 y T2), tienen el potencial para incrementar tasa de crecimiento, actividad antioxidante, proliferación de hemocitos y activar mecanismos asociados a la respuesta inmune, seguidos por los CBADs formulados a partir de sílice y ácido fosfórico (T3) (López-Carvallo et al., 2019).

Esto podría explicar la eficacia que tienen los CBADs en juveniles de almeja Catarina *A. ventricosus* para incrementar supervivencia cuando los organismos son retados contra patógenos (Ortíz-Cornejo *et al.*, 2017, Mazón-Suástegui *et al.*, 2017) y los resultados previos del grupo de trabajo homeopatía acuícola (CIBNOR) quienes han establecido que los CBADs formulados a partir de veneno de alacrán (Vidatox<sup>®</sup>), *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup>, *Silicea terra*<sup>®</sup>, metasilicatos de sodio y lisados de vibrios patógenos (*V. alginolyticus* + *V. parahaemolyticus*), pueden (a) incrementar la respuesta de defensa de los organismos (bivalvos, peces y camarón) cuando son retados contra patógenos, (b) incrementar reservas energéticas y crecimiento, (c) reducir proliferación de parásitos y (d) ser una mejor alternativa al uso profiláctico de antibióticos para el cultivo de *A. ventricosus* (Mazón-Suástegui *et al.*, 2017; Mazón-Suástegui *et al.*, 2019a, 2019c; Rosero-García *et al.*, 2019).

Los resultados de este estudio sugieren que el incremento de la actividad antioxidante, principalmente en manto y glándula digestiva, acompañada de un incremento en la proliferación de hemocitos en glándula puede estar relacionado a procesos de internalización y eliminación de los CBADs. El hecho de que se haya observado un incremento de hemocitos en glándula por efecto de T1, T2, T3 y T5 sugiere que la aplicación de CBADs permite mantener activas las células centinelas (ej. hemocitos) de los organismos tratados, manteniendo alerta al sistema vigilancia asociado a la activación de la respuesta inmune. Esta sugerencia es respaldada por el análisis transcriptómico, en el cual no se observa una activación propiamente dicha de la respuesta inmune, pero sí de procesos relacionados a los mecanismos de la respuesta inmune, como el sistema de reconocimiento de lo no-propio, el proceso de internalización vía endocitosis y la activación de marcadores asociados a la inhibición de la apoptosis.

Esto indica un potencial de respuesta relacionada con la proliferación de hemocitos sin necesidad de activar en su totalidad al mecanismo de defensa de los organismos tratados con CBADs. Sin bien los hemocitos son considerados indicadores de la activación de la respuesta inmune, por ser los principales efectores celulares del sistema inmune en los mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos (Canesi *et al.*, 2002; Allam *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2010). Estas células también fungen un papel relevante como centinelas y su proliferación no siempre es asociada a la activación de

respuesta inmune ya que también se han visto implicados en reciclamiento de nutrientes, reabsorción de gónada y reparación de concha (Mount *et al.*, 2004; Kádár, 2008; Song *et al.*, 2010; Moyano *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Prego-Faraldo *et al.*, 2017). Lo anterior sugiere que los CBADs, al ser altamente diluidos, actúan de manera distinta a las concentraciones que convencionalmente son utilizadas en los inmunoestimulantes comunes (polisacáridos, oligosacáridos, hierbas y microorganismos inactivados). Concentraciones que activan mecanismos de la respuesta inmune relacionada a incrementos en la actividad bactericida y citotóxica, así como procesos relacionados a la liberación de péptidos antimicrobianos (Wang *et al.*, 2017; Antony *et al.*, 2011; Mohan *et al.*, 2019).

Lo anterior podría explicar por qué juveniles de jurel *S. rivoliana* tratados con CBADs *Silicea terra*<sup>®</sup> + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> sub-regularon los genes IL-1 $\beta$  y MyD88 cuando fueron tratados de manera profiláctica, y sin embargo, estos mismos genes fueron altamente sobre-regulados durante el reto contra el patógeno *V. parahaemolyticus* (Mazón-Suástegui *et al.*, 2019a). Basados en lo anterior y debido a que en nuestro estudio encontramos la sobre-regulación de receptores toll-like asociados a MyD88, sugerimos que la activación del sistema de reconocimiento de lo no-propio sin necesidad de activar toda la maquinaria de la respuesta inmune, podría ser la responsable de mejorar la respuesta de los organismos frente a un proceso de infección. Se sabe que cuando los mecanismos de defensa son activados antes de un proceso de infección, los organismos tienen más probabilidades de sobrellevar exitosamente un proceso de enfermedad, lo cual es un principio básico en favor del uso de inmunoestimulantes en acuicultura (Wang *et al.*, 2017). Al respecto, los resultados de la presente investigación, sugieren que con la activación de mecanismos asociados al reconocimiento de lo no-propio, los organismos podrían activar de una manera más eficiente su sistema de defensa y podrían sobrellevar de manera exitosa un proceso de infección. Al fomentar un incremento en la producción de hemocitos se puede dar como resultado una mayor protección contra bacterias patógenas y contribuir a incrementar la tasa de supervivencia de los organismos (Macey y Coyne, 2005). No obstante, estudios posteriores son necesarios para comprobar lo anterior.

Cabe destacar que en la evaluación de transcritos asociados al reconocimiento de lo no-propio, procesos de internalización y respuesta inmune, se registró una mayor

regulación de transcritos en tejido de manto en comparación a branquia y glándula digestiva. Este último tejido fue el único que presentó una proliferación de hemocitos por efecto de los CBADs. Estos resultados pueden ser atribuidos a que el manto y las células epiteliales de su mucosa, son la primera línea de defensa que se encuentra en contacto con el medio ambiente y con potenciales agentes infecciosos como moléculas orgánicas, inorgánicas y patógenos (Günther *et al.*, 2018). Las células epiteliales tienen la capacidad de endocitar partículas abióticas y bióticas, y activar señales para incrementar la proliferación de hemocitos, que son los principales efectores de la respuesta inmune (Allam *et al.*, 2015). Tanto las células epiteliales como los hemocitos son capaces de detectar invasores o agentes extraños por medio de receptores reconocedores de patrones (RRP, PRR por sus siglas en inglés), permitiendo a los organismos detectar una señal potencial de peligro (Allam *et al.*, 2015).

En cuanto a glándula digestiva, el incremento de hemocitos se atribuyó a un reconocimiento de los CBADs ya que estas células se encuentran relacionadas a una respuesta focal (Wang *et al.*, 2016), mientras que la baja regulación de transcritos asociada a mecanismos de la respuesta inmune podría deberse a que no hay un estímulo (eg. presencia de patógenos, alta carga de antígenos) que detone propiamente esta respuesta. Se sugieren realizar experimentos posteriores incluyendo retos para evaluar la presencia de receptores toll like en glándula digestiva y validar el escenario planteado, ya que la proliferación de hemocitos en glándula digestiva también podría deberse a una respuesta sistémica (Wang *et al.*, 2016) por efecto de liberación de citoquinas u otras moléculas por parte de células epiteliales de manto.

En el análisis transcriptómico y RT-qPCR, se detectó la sobre regulación de diversos RRP (receptores de la familia toll-like, receptor STING y proteína de reconocimiento de peptidoglicanos PGRP\_SC2) receptores clave en la activación de mecanismos de reconocimiento de lo no-propio. Los receptores toll-like (TLR) son altamente conservados en el reino animal y se ha demostrado que pueden activar la respuesta inmune en bivalvos marinos por medio de la detección de patrones moleculares asociados a patógenos y daño (por sus siglas en inglés PAMPs y DAMPs, respectivamente) (Ertl *et al.*, 2016).

Particularmente en el presente estudio, la sobre regulación de TLR2 en manto de los organismos tratados con los CBADs de los tratamientos T1 y T2, se atribuyó a la presencia de compuestos altamente diluidos derivados de los lisado bacterianos iniciales (TMs) de *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*, mientras que la sobre-regulación de TLR2 por efecto de T3 en tejido de manto y branquia, se asoció a la posible presencia de nanopartículas de sílice. Esto se sugiere con base a que TLR2 es un receptor de membrana asociado al reconocimiento PAMPs, como los lipopolisacáridos (Zähringer *et al.*, 2008; West *et al.*, 2011; Oliveira-Nascimento *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2019) que pueden ser encontrados en bacterias gram negativas como *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* (Hisatsune *et al.*, 1982). En cuanto al tratamiento T3, la interacción de sus componentes (metasilicatos de sodio - ácido fosfórico 1D) con el receptor TLR2, no ha sido reportada en bibliografía; sin embargo, se ha reportado una interacción de TLR2 con SiO<sub>2</sub> en macrófagos alveolares de ratón, lo que provoca su activación (Beamer *et al.*, 2016).

La sobre regulación de TLR6 en manto por efecto de los lisados de *Vibrio* (tratamiento T2) se asoció a la presencia de PAMPs que han demostrado interactuar con este receptor (Gerdol *et al.*, 2018), y su sobre-regulación por efecto de VidatoX<sup>®</sup> (tratamiento T5) se asoció a la presencia de alguna toxina, ya que se ha demostrado que toxinas como la saxitoxina pueden incrementar la transcripción de TLR6 (Detree *et al.*, 2016). En cambio, la sobre regulación de TLR6 por efecto de *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C (tratamiento T3) en branquia y metasilciato de sodio 1D – ácido fosfórico 1D (tratamiento T4) en manto, se asoció principalmente a la presencia de nanopartículas de sílice, ya que la activación de TLR6 se ha relacionado con nanopartículas de óxido de zinc (Roy *et al.*, 2014).

La sobre-regulación de TLR4 por efecto de los CBADs del tratamiento T2 se asoció a PAMPs ultra diluidos, mientras que la acción de los CBADs del tratamiento T4 fue atribuida a nanopartículas de sílice. TLR4 se ha asociado a la presencia de componentes bacterianos (West *et al.*, 2011) pero también de sílice. De acuerdo a la bibliografía, las nanopartículas de óxido de silicio (SiO<sub>2</sub>), uno de los componentes de *Silicea terra*<sup>®</sup>, incrementa la expresión del gen TLR4a en embriones del pez Dino zebra (Hu *et al.*, 2016). En juveniles de *S. rivoliana* el tratamiento formulado con *Silicea terra*<sup>®</sup> + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> sobre regula transcritos de MyD88, sólo cuando los

organismos son infectados con *V. parahaemolyticus* (Mazón-Suástegui *et al.*, 2019a). Cabe señalar que la sobre-regulación del modulador de respuesta inmune MyD88 está altamente ligada al receptor TLR4 (Laird *et al.*, 2009), lo que sugiere que la sobre regulación de TLR4 en organismos tratados con los CBADs del tratamiento T4 se encuentra asociada principalmente a la acción de *Silicea terra*<sup>®</sup>. En cuanto a la sobre-regulación de TLR3, ésta fue registrada en manto por efecto de los CBADs de los tratamientos T2, T3 y T4, y en glándula digestiva por efecto de los CBADs del tratamiento T3. Aunque la mayoría de los estudios asocian la sobre regulación de TLR3 con el reconocimiento de diferentes virus, vía reconocimiento de la doble cadena de RNA (Tatematsu *et al.*, 2013; Jiménez-Dalmaroni *et al.*, 2016), su sobre-regulación también ha sido asociada a nanopartículas de oro, cuando éstas son usadas para inmunoestimular camarones (Tello-Olea *et al.*, 2019) y también a lipopolisacáridos, vía ruta metabólica dependiente de TLR4-MyD88-IRAK-TRAF6-NF- $\kappa$ B, en macrófagos alveolares (Ding *et al.*, 2017). Sin embargo, ya que no hay información referente a la interacción entre TLR3 y sílice o ácido fosfórico, podemos plantear por primera vez que la inducción de la transcripción de TLR3 está asociada a la exposición de sílice y ácido fosfórico altamente diluidos.

En cuanto al receptor citosolico STING, se registró una sobre-regulación por efecto de todos los CBADs de todos los tratamientos en glándula digestiva, mientras que en manto se detectó por efecto de los CBADs de los tratamientos T1 y T4 y en branquia por efecto de los CBADs de los tratamientos T1, T3 y T4. STING es un receptor citosolico que ha sido registrado en *Mytilus spp.* y se ha relacionado con la detección de ácidos nucleicos exógenos de virus o bacterias (Venier *et al.*, 2016), pero también tiene la capacidad de detectar vita-PAMPs, lo cual permite a las células hospedero discriminar entre microorganismos vivos y muertos, y solo desencadenar procesos altamente pro-inflamatorios cuando se detectan microorganismos vivos (Blander y Sander, 2012; Moretti *et al.*, 2017). Esto sugiere que los CBADs también están siendo detectados dentro de la célula a un nivel citosolico y permite asumir que los CBADs pueden estar siendo detectados como señal de peligro de baja intensidad que no comprometen la vida de la célula al no detectar vita-PAMPs (Patógenos vivos). La interacción entre los componentes de sílice o ácido fosfórico y el receptor STING es reportada por primera vez en esta investigación y no ha sido documentada en otros



estudios publicados. En este estudio los componentes del tratamiento T3, formulado a base de metasilicatos de sodio y ácido fosfórico 1D, se relacionaron con la sobre regulación del receptor PGRP\_SC2, asociado al reconocimiento de peptidoglicanos que son componentes bacterianos (Gómez-Chiarri *et al.*, 2015b). Esta información sugiere que el uso alternado de CBADs formulados a base de metasilicatos de sodio y ácido fosfórico 1D, puede activar RRP, asociados a patógenos aparentemente sin la necesidad de contener PAMPs. Derivado de los análisis de expresión de RRP en esta investigación se sugiere que la sobre-regulación principalmente de los receptores toll-like y STING en juveniles de almeja *Catarina A. ventricosus* puede ser mediada por la presencia de PAMPs y DAMPs, encontrados de manera altamente diluida en los CBADs. Esto conduce a plantear que dichos receptores podrían ser utilizados como marcadores en futuras investigaciones en las cuales se evalué el uso profiláctico de CBADs incluyendo retos contra patógenos.

Cuando señales de peligro asociadas a la presencia de agentes extraños (ej. bacterias, lipopolisacáridos, nanopartículas, metales) son detectadas por RRP (ej. receptores toll-like), se puede llevar a cabo la activación de varios mecanismos implicados en el reconocimiento, neutralización, internalización y eliminación de intrusos, dependiendo del tipo del estímulo (ej. Antígeno), concentración y tiempo de exposición. Los mecanismos activados en este estudio fueron dependientes del tratamiento y de su dilución. Principalmente se sobre- o sub- regularon rutas metabólicas asociadas al proceso de endocitosis, citoprotección (antiapoptosis, sistema antioxidante, proteínas HSP) y respuesta inmune, pero sin activar completamente la respuesta inmune, ya que no se observó la regulación de moduladores o efectores asociados a su activación (ej. péptidos antimicrobianos, sistema profenol oxidasa, citoquinas, lisozimas, moduladores de importancia en la activación de la respuesta inmune como MyD88 y TRAF6).

Se sabe que la presencia de partículas abióticas y bióticas como los PAMPs activa mecanismos relacionados a endocitosis, lisosoma y fagosoma (Günther *et al.*, 2018; Allam y Raftos, 2015), para destruir moléculas potencialmente dañinas o microorganismos patógenos. La activación de estos mecanismos puede desencadenar cascadas de señalización como la ruta de señalización NF-kappa B (Genard *et al.*, 2013), modulada para transcribir genes relacionados a la respuesta inmune. Con base

a lo anterior, los resultados de la presente investigación sugieren que los organismos reconocieron y respondieron a los CBADs utilizados en la presente investigación.

Producto del análisis transcriptómico y RT-qPCR, se registró que el proceso de endocitosis fue regulado por efecto de todos los tratamientos, y aunque en el análisis transcriptómico de los organismos pertenecientes al tratamiento T2 mostró una sub-regulación de la ruta metabólica de endocitosis, en análisis RT-qPCR se observó una sobre-regulación de este proceso. En cuanto a los otros tratamientos (T1, T3, T4 y T5), en ambos análisis se observó una tendencia a sobre-regular procesos de endocitosis. En este estudio, entre los principales genes involucrados en el proceso de endocitosis se registraron genes asociados a un proceso de endocitosis temprana (CAV1 y SRC) y tardía (VPS25, HEXA y CALR). En específico, la sobre regulación de CAV1, un gen que codifica para una proteína estructural de la caveola, se registró en branquia de organismos tratados con T1, T3, T4 y T5. Debido a que se ha reportado que CAV1 participa en la movilización transendotelial y tráfico celular que incluye la movilización de nanopartículas (Moore *et al.*, 2006) y de ciertos virus, bacterias y toxinas (Harris *et al.*, 2002; Sverdlov *et al.*, 2007; Zaas *et al.*, 2009; Sahay *et al.*, 2010), se sugiere que los CBADs están siendo internalizados vía caveola en branquia. Por otra parte, la sobre-regulación de SRC en manto de organismos tratados con T1, T2 y T4 y T5, y en branquia, de organismos del tratamiento T3, sugiere la posibilidad de la activación de rutas de endocitosis para internalización de los CBADs. SRC se encuentra involucrado en el mecanismo de fagocitosis mediante la organización del citoesqueleto de actina y forma celular, y puede ser mediado por la presencia de bacterias o vía internalización de caveola mediada por receptores (Sverdlov *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2007; Cossart y Helenius, 2014). Lo anterior sustenta que el proceso de endocitosis está siendo mediado por receptores ya que se observó una sobre-regulación de PRR asociados a respuesta inmune y procesos de internalización asociados a receptores.

Los resultados de la presente investigación sugieren que la internalización vía endocitosis permitió la formación de endosomas tardíos, ya que VPS25 fue sobre-regulado en glándula digestiva y branquia de los organismos tratados con los CBADs de los tratamientos T1, T2 y T3, y en manto de los organismos tratados con los CBADs del tratamiento T1. VPS25 se encuentra asociado a la membrana de endosomas

tardíos y participa en el complejo de acomodo endosomal requerido para transporte (ESCRT-II, por sus siglas en inglés), el cual acomoda proteínas ubiquitinadas de la membrana de los endosomas (ej. receptores de membrana), y transporta las proteínas del endosoma maduro hacia los lisosomas por medio de los cuerpos multivesiculares (MVB, por sus siglas en inglés) (Babst *et al.*, 2002; Gill *et al.*, 2007; Schmidt *et al.*, 2012). Debido a que los MVB pueden interactuar con los lisosomas, y HEXA, una enzima hidrolítica localizada en lisosomas, y relacionada con la defensa del hospedero (Koo *et al.*, 2008), fue sobre-regulada en manto de los organismos tratados con los CBADs de los tratamientos T2 y T5, se sugiere que estos tratamientos permitieron la formación de fagolisosomas o endolisosomas, los cuales se encuentran involucrados en la degradación de macromoléculas (Bright *et al.*, 2016). Aunado a lo anterior en el análisis transcriptómico, se observó la sobre-regulación en manto de la proteína de unión a vibrio (CALR), asociada al fagosoma que puede ser liberada de la célula para neutralizar vibrios (Tarr *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2016), por efecto de los CBADs de los tratamientos T1 y T4. Con base a estos resultados y tomando en cuenta que la degradación de moléculas por medio de hidrolasas dentro de las células, ocurren como resultado de la fusión entre lisosomas y endosomas tardíos/MVB (Bright *et al.*, 2016), se confirma la activación de mecanismos de internalización por efecto de reconocimiento de CBADs vías receptores y su destrucción dentro de la célula.

Entre los procesos regulados por efecto de los CBADs también se observó una sobre-regulación de marcadores asociados a citoprotección, como la proteína inhibidora de apoptosis (IAP), proteínas chaperonas (HSP90) y enzimas antioxidantes (CAT). La sobre-regulación de IAP en glándula digestiva de organismos tratados con T1, T3 y T4, y en manto, de organismos tratados con los CBADs de los tratamientos T1, T2 y T4, sugieren la activación de la ruta antiapoptótica, ya sea por medio de la inhibición del receptor TNF (de Almagro y Vucic, 2012), o mediante la inhibición de caspasas (Sarkar *et al.*, 2009). No obstante, hay que remarcar que IAP (también conocido como BIRC3 y c-IAP2), no solo se encuentra relacionado al proceso de antiapoptosis, sino que también puede inducir citoquinas y transcripción de genes proinflamatorios promedio, de la ruta de señalización MAPK y NF- $\kappa$ B (de Almagro y Vucic, 2012). Sin embargo, como no se detectó una respuesta proinflamatoria o transcripción de genes asociados a efectores de la respuesta inmune, se sugiere que la sobre-regulación de IAP está

relacionada a procesos antiapoptóticos, lo cual puede ser una estrategia para mantener a la célula viva mientras se internaliza los CBADs.

Otro resultado obtenido fue la sobre-regulación de HSP90 por efecto de casi todos los tratamientos (T3 y T4 en branquia; T1, T2 y T4 en manto) con excepción del tratamiento mayormente diluido (T5); y mostró especificidad por tejido dependiendo del tratamiento. Se sabe que en moluscos bivalvos, HSP90 es un gen tejido específico y puede ser inducido para mantener la homeostasis del organismo y proteger a las células, por lo que es activado por diversas señales de estrés y juega un papel muy importante en el plegamiento de proteínas, a fin de activarlas o estabilizarlas (Fabbri *et al.*, 2008; Iryani *et al.*, 2017). Debido a que HSP90 puede ser inducido con diversas señales de estrés, su sobre-regulación confirma la capacidad de los organismos de detectar los PAMPs y DAMPs de los CBADs.

Por otra parte, en el análisis de bioquímica enzimática, los organismos tratados con los CBADs de los tratamientos T1, T2 y T3 incrementaron la actividad catalasa (CAT) en manto y branquia, en comparación a los demás grupos experimentales, mientras que en el análisis de RT-qPCR no se registraron cambios en la expresión como efecto de dichos tratamientos, pero sí se observó una sobre-regulación de CAT por efecto de los tratamientos T1 y T4 en el análisis transcriptómico. Por su parte la actividad SOD detectada por actividad enzimática no fue registrada a nivel molecular. Sin embargo, en el análisis bioquímico de actividad enzimática se registró un incremento por efecto de todos los tratamientos (T1, T2, T3, T4 y T5) en tejido de glándula digestiva. Lo anterior sugiere que la actividad antioxidante puede ser promovida a nivel bioquímico principalmente por los tratamientos elaborados con lisados de bacterias patógenas 1D y 7C, y metasilicato de sodio 1D + ácido fosfórico 1D, a los cuales ya se les ha atribuido este efecto en literatura al utilizar medicamentos homeopáticos, incluyendo los CBADs y otras diluciones no homeopáticas (González-Muñoz *et al.*, 2008; Canesi *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013b; Mazón-Suástegui *et al.* 2017). El incremento en la actividad enzimática de CAT y SOD ha sido reportado en organismos expuestos a toxinas (Prego-Faraldo *et al.*, 2017) y en presencia de compuestos provenientes de bacterias (Song *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013b). Particularmente, la actividad CAT ha demostrado contribuir al balance redox en las almejas *Chlamys farreri* y *Meretrix meretrix*, mediante la neutralización del estrés oxidativo causado por el ataque de

bacterias patógenas vivas (Li *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2013b) y muertas por calor (*V. splendidus* y *V. anguillarum*), en el mejillón *Mytilus galloprovincialis* (Canesi *et al.*, 2010).

Mazón-Suástegui *et al.* (2017) han reportado un incremento en la actividad SOD en juveniles de *A. ventricosus* tratados de manera profiláctica con el medicamento homeopático *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup>, y una mayor supervivencia cuando los organismos fueron retados ante *Vibrio parahaemolyticus*. La activación de enzimas antioxidantes, las cuales fortalecen a los organismos en contra del estrés oxidativo y la producción de hemocitos, puede contribuir a sobrellevar condiciones de estrés como puede ser, una enfermedad. Los resultados de la presente investigación demuestran que los CBADs evaluados, y particularmente aquellos formulados a partir de bacterias patógenas, son capaces de regular una respuesta asociada a la actividad enzimática bioquímica de SOD y CAT indicando una posible acción de citoprotección en juveniles de almeja Catarina *A. ventricosus*, ya que estas enzimas permiten a los organismos sobrellevar de una mejor manera eventos de estrés oxidativo causados por factores ambientales, por contaminantes o por infecciones causadas por patógenos (Vlahogianni *et al.*, 2007, Song *et al.*, 2010). Las enzimas SOD y CAT tienen la capacidad de transformar compuestos citotóxicos producidos por especies reactivas de oxígeno como anión superóxido y peróxido de hidrogeno, en productos no dañinos para la célula, como agua y oxígeno (Song *et al.*, 2010). Las diferencias entre los resultados de análisis moleculares y bioquímicos podrían estar asociadas a mecanismos post-transcripcionales o translacionales (Vogel y Marcotte, 2012).

Entre los genes asociados a respuesta inmune registrados en el análisis transcriptómico se evaluaron tres por RT-qPCR: FILA –asociado al movimiento celular- (Yue *et al.*, 2013; Urra *et al.*, 2018), TRAF3 –implicado en la señalización de respuesta inmune en bivalvos- (Qu *et al.*, 2017) y CYT –ligado a la producción de especies reactivas de oxígenos asociadas a la erradicación de patógenos, apoptosis y activación de la ruta señalización NF-kB (West *et al.*, 2011; Lobet *et al.*, 2015). El gen FILA solo fue sobre-regulado en branquia de organismos tratados con los CBADs del tratamiento T3, lo que sugiere una estimulación del movimiento celular y una mayor susceptibilidad del tejido branquial hacia metasilicatos de sodio y ácido fosfórico 1D. Cabe señalar que es necesario conocer el tipo de célula en la branquia que expresó FILA, para poder

dilucidar la implicación de este gen en el reconocimiento del CBAD formulado a partir de metasilicatos de sodio y ácido fosfórico 1D. La regulación de TRAF3 se evaluó debido a que su sobre-regulación está implicada con el sistema innato de defensa de los moluscos bivalvos ante infecciones virales y bacterianas (Qu *et al.*, 2017), jugando un papel muy importante en las rutas de señalización asociadas a los receptores toll-like y RIG-I-like (West *et al.*, 2011; Qu *et al.*, 2017; Xie *et al.*, 2013). Debido a que TRAF3 fue sobre regulado por los CBADs del tratamiento T1 y está altamente implicado en la respuesta contra bacterias gram negativas (Qu *et al.*, 2017), se sugiere que los antígenos presentes en los lisados de *Vibrio* altamente diluidos fueron capaces de desencadenar la regulación de TRAF3. Cabe señalar que TRAF3 ha sido relacionado al proceso de exocitosis en células epiteliales para desechar bacterias de la región intracelular (Miao y Wu, 2016). Por ello, y debido a que no se activó propiamente la respuesta inmune, la sobre regulación de TRAF3 por efecto de los CBADs del tratamiento T1 podría sugerir la transportación de compuestos bacterianos del interior de la célula hacia el exterior de la misma, en lugar de activar una respuesta proinflamatoria. Esto debe ser analizado a mayor detalle, y falta dilucidar si los CBADs son desechados o eliminados dentro de la célula que reconoce el compuesto, ya que se observaron marcadores asociados a la presencia de fagosomas por efecto de los CBADs del tratamiento T1.

Debido a que en nuestro análisis transcriptómico se registró la regulación de fosforilación oxidativa ya que la producción de especies reactivas de oxígeno en mitocondria están altamente ligadas a la erradicación de patógenos, apoptosis y activación de la ruta de señalización NF- $\kappa$ B (West *et al.*, 2011; Lobet *et al.*, 2015), se decidió evaluar CYT, el cual también es esencial para llevar a cabo la respiración celular ya que codifica para una proteína acarreadora de electrones. En este estudio, CYT fue sub-regulado en manto por efecto de los CBADs de los tratamientos T1 y T5, y sobre-regulado en branquia por efecto de los CBADs de los tratamientos T1, T3 y T5, lo cual sugiere que el tejido branquial es más susceptible a la interacción con los CBADs. Sin embargo, debido a que la regulación de CYT está implicada en diversos procesos, se requiere realizar más evaluaciones utilizando biomarcadores relacionados a los procesos biológicos mencionados, con el fin de entender si su sobre-regulación está

asociada al incremento de la producción de energía o a procesos directamente relacionados con la respuesta inmune.

Cabe destacar que el tratamiento T5 (VidatoX<sup>®</sup>), fue el único que tuvo un efecto distinto en comparación con los demás tratamientos, en particular sobre los resultados obtenidos a partir del análisis transcriptómico, ya que se observó la regulación de otro tipo de procesos que también se encuentran asociados a infección bacteriana como melanogénesis, hematopoyesis y transporte de calcio (Allam y Raftos, 2015; West *et al.*, 2011). No obstante, aunque su aplicación demostró promover la proliferación de hemocitos en glándula digestiva y sobre-regular RRP y genes relacionados al proceso de endocitosis en el análisis RT-qPCR, su efecto inmunomodulador a nivel molecular no fue claro en el análisis transcriptómico.

Al respecto, y como se ha descrito anteriormente, muchos de los genes relacionados con los mecanismos de defensa fueron regulados con la aplicación de CBADs. Específicamente aquellos asociados a las etapas tempranas en la activación de la respuesta inmune innata y en la actividad centinela, por efecto de los tratamientos T1, T2 y T3. La activación de estos genes sugiere que la eficacia del uso de los CBADs para fortalecer a los organismos en contra de infecciones, radica en la activación de mecanismos asociados al reconocimiento de moléculas no propias, sin necesidad de activar propiamente la respuesta inmune.

Por último, *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C junto a *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C (tratamiento T4) modularon la respuesta inmune (al regular los marcadores de respuesta inmune utilizados en este estudio) e indujeron un incremento en las reservas energéticas de las almejas tratadas, incluyendo la acumulación de carbohidratos (manto, músculo) y de lípidos (glándula digestiva y músculo). Los resultados obtenidos coinciden con la literatura consultada, ya que se ha demostrado que las reservas de carbohidratos en moluscos bivalvos se encuentran íntimamente asociadas a músculo, y las reservas lipídicas a glándula digestiva (Maguire *et al.*, 1999; Darriba *et al.*, 2005). Músculo y glándula digestiva han sido reportados como los principales órganos de reserva energética en moluscos bivalvos (Lodeiros *et al.*, 2001; Barber y Blake, 2006). La depleción de proteínas en todos los grupos experimentales, comparado con los valores registrados al inicio del experimento (To), podría indicar una condición nutricional adecuada en los organismos

mantenidos en laboratorio, lo que permitió la acumulación de otras reservas energéticas, ya que la reducción en el contenido de proteínas ha sido asociada a un incremento de carbohidratos y lípidos (Freites *et al.*, 2003). Como todas las almejas de todos tratamientos recibieron la misma dieta, un incremento en las reservas energéticas por efecto del tratamiento *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C se atribuyó a la mejora del proceso de asimilación de reservas energéticas. El sílice ha sido asociado a formación de tejido óseo y conectivo; se une a componentes de polisacáridos y de proteínas en tejido conectivo (Birchall, 1995), pero también se ha asociado a un incremento en la regulación de enzimas digestivas en juveniles de jurel *S. rivoliana* tratados con *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C (Mazón-Suástegui *et al.*, 2019b). En diluciones homeopáticas, el medicamento *Silicea terra*<sup>®</sup> ha sido reportado como promotor de crecimiento en *A. ventricosus* (Mazón-Suástegui *et al.*, 2017), mientras que en preparaciones no homeopáticas, el dióxido de sílice incorporado en la dieta de pavos al 0.02%, ha incrementado crecimiento y fomenta la reducción de pérdida de nitrógeno (Tran *et al.*, 2015). Phromkunthong (2015) reportó que el complemento SILICA+, que se vende como polvo de sílice micronizado, incrementa la actividad de las enzimas peptidasas, CAT y SOD, y mejora el crecimiento del camarón blanco *L. vannamei*. En este caso, el ácido fosfórico en presentación homeopática es recomendado para promover la asimilación de nutrientes en humanos y promover el apetito (Gibson, 1967). No obstante que la combinación de *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C y *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C genera un buen efecto sinérgico, es recomendable realizar una evaluación comparativa más detallada entre ambos medicamentos homeopáticos, en lo relativo a la activación de enzimas digestivas. Esto permitiría para elucidar si ambos CBADs actúan sobre la actividad enzimática y ayudan a promover la asimilación de nutrientes, o bien, si el proceso se lleva a cabo por medio de otra vía.

Un incremento en el IGD ha sido asociado a una mejor condición nutricional (Cartier *et al.*, 2004). Los resultados de la presente investigación soportan la idea de que la condición nutricional, en términos de reservas energéticas, fue mejorada en condiciones de laboratorio, pero con respecto a los índices fisiológico IGD y IML, no se observó un efecto claro entre tratamientos y grupos control. Sin embargo, las almejas que recibieron el tratamiento T4, mostraron una mayor acumulación de reservas de carbohidratos en músculo y el mayor índice de IME, lo que refleja una acumulación de



reservas producida por la adición de los CBADs. En algunos pectínidos, el músculo estriado tiene un mayor contenido de carbohidratos que el músculo liso (Maguire y Burnell, 2001), lo cual sugiere que los carbohidratos almacenados se dirigen mayormente hacia músculo estriado. A esto se atribuyó la relación observada en las almejas que recibieron el tratamiento T4, ya que se observó el mayor contenido de carbohidratos en músculo y el mayor crecimiento de músculo estriado (IME).

Los CBADs formulados a partir de bacterias patógenas no solo demostraron activar células y procesos relacionados a la respuesta inmune, sino que también promovieron un mayor crecimiento en los organismos, lo cual fue inesperado, ya que las almejas del tratamiento *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C + *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C mostraron un mayor contenido de reservas energéticas. Cabe señalar que en los tratamientos donde se observó un mayor conteo de hemocitos, también se registró el mayor crecimiento en altura de la concha. Se sabe que los hemocitos no solo contribuyen a la defensa en moluscos bivalvos, sino que también contribuyen a reparar la concha, y a la digestión y transporte de nutrientes (Beninger y Le Pennec, 2006). En el mejillón *Bathymodiolus azoricus*, los hemocitos juegan un papel muy importante en el transporte de calcio para la reparación de la concha (Mount, 2004). Se ha demostrado que los hemocitos median la mineralización de concha y pueden transportar calcio para contribuir a su crecimiento (Kádár, 2008), e incluso pueden involucrarse directamente en la producción de cristales de calcita y aragonita en ostras. Estos descubrimientos sugieren que los hemocitos podrían estar contribuyendo a la formación de la concha, y a la vez, ayudando a incrementar su calcificación, lo que podría verse reflejado en un mayor crecimiento en altura. Sin embargo, para poder concluir al respecto, es recomendable realizar más estudios dirigidos a determinar si la estimulación de producción de hemocitos puede contribuir al crecimiento de concha en juveniles de *A. ventricosus*.

## 9. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos y de su discusión previa, es posible concluir que los CBADs utilizados en la presente investigación doctoral, mostraron un efecto cuantificable a nivel fisiológico, incrementando el conteo de hemocitos y la actividad antioxidante. Es importante destacar que los efectos más visibles se obtuvieron principalmente con la aplicación de aquellos formulados en el CIBNOR, a partir de cepas virulentas de las bacterias patógenas *Vibrio parahaemolyticus* y *V. alginolyticus* 1D y 7C (T1 y T2). Estas formulaciones se encuentran actualmente en proceso de protección industrial en el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI), bajo la titularidad del CIBNOR. Por otro lado, el tratamiento formulado a partir de *Silicea terra*<sup>®</sup> 7C y *Phosphoricum acidum*<sup>®</sup> 7C (T4) incrementó reservas energéticas en los principales tejidos de reserva, indicativo de que este tratamiento es un potencializador de la asimilación de nutrientes.

A nivel molecular, los resultados mostraron que los CBAD's, en particular aquellos utilizados en los tratamientos T1, T2 y T4, regulan mecanismos asociados al reconocimiento de lo propio y endocitosis, lo que podría permitir a los organismos estar alerta ante la presencia de antígenos como PAMPs o DAMPs, si necesidad de activar completamente una respuesta de defensa, que implicaría un mayor gasto energético.

Con base a los resultados obtenidos durante la presente investigación, se sugiere que los CBADs en baja dilución activan una mayor cantidad de mecanismos asociados a la respuesta y acción del sistema inmune (efectores), mientras que altas diluciones activan solo los primeros mecanismos de defensa, asociados a reconocimiento (receptores), en juveniles de *A. ventricosus*.

A nivel general, los resultados respaldan la hipótesis de trabajo inicialmente propuesta, y permiten confirmar la modulación de moléculas asociadas a la respuesta inmune mediante la aplicación de CBADs, a los cuales se atribuye un efecto protector en organismos marinos.

Referente al cultivo de moluscos bivalvos, los resultados obtenidos y previamente discutidos, indican que los CBADs, mejoran o ayudan a mantener la condición general

de juveniles de *A. ventricosus* en fase de pre-engorda, y por lo tanto resultan potencialmente aplicables en laboratorios de producción de semilla de pectínidos y de otros moluscos bivalvos.

## **PRESPECTIVAS**

La presente investigación permite plantear las siguientes interrogantes:

¿Es necesaria la activación total de la respuesta inmune para proteger a los organismos ante un patógeno?,

¿Una estimulación moderada pero suficiente para permitir la proliferación de PRR puede desencadenar una respuesta inmune en organismos retados ante un patógeno, de manera que puedan evitar o sobrellevar exitosamente el proceso de infección relacionado?

## 10. LITERATURA CITADA

- Aabel S, Fossheim S, Rise F. Nuclear magnetic resonance (NMR) studies of homeopathic solutions. *Br. Homeopath. J.* 2001; 90:14-20.
- Abasolo-Pacheco F, Campa-Cordova AI, Mazón-Suástegui JM, Tovar-Ramírez D, Araya R, Saucedo PE. Enhancing growth and resistance to *Vibrio alginolyticus* disease in catarina scallop (*Argopecten ventricosus*) with *Bacillus* and *Lactobacillus* probiotic strain during early development. *Aquac. Res.* 2017; 48:4597-4607.
- Allam B, Paillard C, Auffret M, Ford SE. Effects of the pathogenic *Vibrio tapetis* on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalve species : II. Cellular and biochemical changes following in vivo challenge. *Fish Shellfish Immunol.* 2006; 20:384-397.
- Allam B, Raftos D. Immune responses to infectious diseases in bivalves. *J. Invertebr. Pathol.* 2015; 131:121-136.
- Andretto AP, Fuzinato MM, Bonafe EG, Braccini GL, Mori RH, Pereira RR, Vargas L. Effect of an homeopathic complex on fatty acids in muscle and performance of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Homeopathy.* 2014; 103:178–185.
- Antony SP, Singh SB, Sudheer NS, Vrinda S, Priyaja P, Philip R. Molecular characterization of a crustin-like antimicrobial peptide in the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and its expression profile in response to various immunostimulants and challenge with WSSV. *Immunobiology.* 2011; 216(1-2): 184-194.
- Babst M, Katzmann DJ, Wendland B, Emr SD. Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev. Cell.* 2002; 3(2):283-289.
- Bachère E, Rosa RD, Schmitt P, Poirier AC, Merou N, Charrière GM, Destoumieux-Garzón D. The new insights into the oyster antimicrobial defense: Cellular, molecular and genetic view. *Fish Shellfish Immunol.* 2015; 46:50–64.
- Bagai U, Rajan A, Kaur S. Antimalarial potential of Nosode 30 and 200 against *Plasmodium berghei* infection in BALB/C mice. *J. Vector Borne. Dis.* 2012; 49:72–77.
- Barber BJ, Blake NJ. Reproductive Physiology. In: Shumway SE, Parsons GJ (Eds.). *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. Boston: Elsevier Science. 2006. p. 357–406.

- Barnes H, Blackstock J. Estimation of lipids in marine animals and tissues detailed investigation of the sulphophosphovanillin method for 'total' lipids. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1973; 12:103–118.
- Bassim S, Genard B, Gauthier-clerc S, Moraga D. Ontogeny of bivalve immunity: assessing the potential of next-generation sequencing techniques. *Rev. Aquacult.* 2015; 7:197–217.
- Bauer M, Weis S, Netea MG, Wetzker R. Remembering Pathogen Dose: Long-Term Adaptation in innate immunity. *Trends Immunol.* 2018; 39(6):438-445.
- Beamer GL, Seaver BP, Jessop F, Shepherd DM, Beamer CA. Acute Exposure to Crystalline Silica educes Macrophage Activation in Response to Bacterial Lipoproteins, *Front. Immunol.* 2016; 7:49.
- Bell IR, Sarter B, Koithan M, Standish LJ, Banerji P, Banerji P. Nonlinear Response Amplification Mechanisms for Low Doses of Natural Product Nanomedicines: Dynamical Interactions with the Recipient Complex Adaptive System. *J. Nanomed. Nanotechol.* 2013; 4:179.
- Bell IR, Schwartz GE. Enhancement of adaptive biological effects by nanotechnology preparation methods in homeopathic medicines. *Homeopathy.* 2015; 104:123–138.
- Bellavite P, Signorini A. *Emerging Science Homeopathy: Complexity, Biodynamics and Nanopharmacology.* USA: North Atlantic Books; 2002. 365 p.
- Bellavite P, Conforti A, Pontarollo F, Ortolani R. Immunology and homeopathy. 2. Cells of the immune system and inflammation. *Evid. Based Complement. Altern Med.* 2006; 3:13–24.
- Bellavite P, Marzotto M, Oliosio D, Moratti E, Conforti A. High-dilution effects revisited. 1. Physicochemical aspects. *Homeopathy.* 2014a; 103:4-21.
- Bellavite P, Marzotto M, Oliosio D, Moratti E, Conforti A. High-dilution effects revisited. 2. Pharmacodynamic mechanisms. *Homeopathy.* 2014b; 103:22-43.
- Bem MM, Barbosa-Solomieu V, Luna-González A. Diagnóstico, prevención, tratamiento y control de enfermedades de moluscos bivalvos con énfasis en especies del género *Nodipecten* spp. En: Maeda-Martínez AM, Lodeiros-Seijo C, (Eds). *Biología y Cultivo de los molucos Pectínidos del Género Nodipecten.* México: Editorial Limusa; 2011. p. 227-250.
- Beninger PG, Le Pennec M. Structure and Function in Scallops. In: Shumway SE, Parsons GJ (Eds.), *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture.* USA: Elsvier; 2006. p. 123-211.

- Benjamin H, Cass L, Williams WV. Application of Transcriptome Analysis to Clinical Pharmacology Studies. *Curr. Mol. Med.* 2005; 5:65-82.
- Betti L, Trebbi G, Kokornaczyk MO, Nani D, Peruzzi M, Dinelli G, Bellavite P, Brizzi M. Number of succussion strokes affects effectiveness of ultra high-diluted arsenic on in vitro wheat germination and polycrystalline structures obtained by droplet evaporation method. *Homeopathy.* 2017; 106:47-54.
- Bhujel RC. *Statistics for Aquaculture*, 1th ed. USA: Wiley-Blackwell; 2008. 222 p.
- Bianchi VA, Castro JM, Rocchetta I, Nahabedian DE, Conforti V, Luquet CM. Long-term feeding with *Euglena gracilis* cells modulates immune responses, oxidative balance and metabolic condition in *Diplodon chilensis* (Mollusca, Bivalvia, Hyriidae) exposed to living *Escherichia coli*. *Fish Shellfish Immunol.* 2015; 42:367–78.
- Bigagli E, Luceri C, Bernardini S, Dei A, Filippini A, Dolara P. Exploring the effects of homeopathic *Apis mellifica* preparations on human gene expression profiles. *Homeopathy.* 2014; 103:127-132.
- Birchall JD. The Essentiality of Silicon in Biology. *Chem. Soc. Rev.* 1995; 351-357.
- Blander JM, Sander LE. Beyond pattern recognition: five immune checkpoints for scaling the microbial threat, *Nat. Rev. Immunol.* 2012; 12(3):215-225.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics.* 2014; 30:2114-2120.
- Bonamin LV, Cardoso TN, Cunha de Carvalho A, Amaral JG. The use of animal models in homeopathic research – a review of 2010 – 2014 PubMed indexed papers. *Homeopathy.* 2015; 104:283-291.
- Bonamin LV, Bellavite P. Immunological models in high dilution research following M Bastide. *Homeopathy.* 2015; 104:263-268.
- Brand AR. Scallop Ecology: Distribution and Behaviour. In: Shumway SE, Parsons GJ (Eds.). *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. Boston: Elsevier Science; 2006. p. 651–744.
- Bricknell I, Dalmo RA. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish Shellfish Immunol.* 2005; 19:457–72.
- Bright NA, Davis LJ, Luzio JP. Endolysosomes Are the Principal Intracellular Sites of Acid Hydrolase Activity. *Curr. Biol.* 2016; 26(17):2233-2245.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 2009; 55:611–22.

- Cáceres-Martínez J. Parasitology. En: Maeda-Martínez AM, Lodeiros-Seijo C, (Eds). *Biología y Cultivo de los moluscos Pectínidos del Género Nodipecten*. México: Editorial Limusa; 2011. p. 257-274.
- Cáceres-Martínez J, Vásquez-Yeomans R. Enfermedades, parásitos y episodios de mortalidad de ostiones de importancia comercial en México y sus implicaciones para la producción. *Cienc. Pesq.* 2013; 21:5-48.
- Caicedo MS, Desai R, McAllister K, Reddy A, Jacob JJ, Hallab NJ. Soluble and Particulate Co-Cr-Mo Alloy Implant Metal Activate the Inflammasome Danger Signaling Pathway in Human Macrophages: A Novel Mechanism for Implant Debris Reactivity. *J. Orthop. Res.* 2009; 27:847-854.
- Camerlink I, Ellinger L, Bakker EJ, Lantinga EA. Homeopathy as replacement to antibiotics in the case of *Escherichia coli* diarrhoea in neonatal piglets. *Homeopathy.* 2010; 99:57–62.
- Campa-Córdova AI, Luna-González A, Mazón-Suastegui JM, Aguirre-Guzmán G, Ascencio F, González-Ocampo HA. Efecto de bacterias probióticas en el cultivo larvario del ostión de placer *Crassostrea corteziensis* (Bivalvia : Ostreidae). *Rev. Biol. Trop.* 2011; 59:183–191.
- Campa-córdova AI, González-ocampo H, Luna-gonzález A, Mazón-suástegui JM, Ascencio F. Growth, survival, and superoxide dismutase activity in juvenile *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) treated with probiotics. *Hidrobiológica.* 2009; 19:151–157.
- Canesi L, Gallo G, Gavioli M, Pruzzo C. Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microsc. Res. Tech.* 2002; 57: 469–76.
- Canesi L, Ciacci C, Lorusso LC, Betti M, Guarnieri T, Tavolari S, Gallo G. Immunomodulation by 17beta-estradiol in bivalve hemocytes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2006; 291:664–673.
- Canesi L, Barmo C, Fabbri R, Ciacci C, Vergani L, Roch P, Gallo G. Effects of *Vibrio* challenge on digestive gland biomarkers and antioxidant gene expression in *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Phys. C.* 2010; 152:399-406.
- Canesi L, Ciacci C, Fabbri R, Marcomini A, Pojana G, Gallo G. Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticles toxicity. *Mar. Environ. Res.* 2012; 76:16-21.
- Carta Nacional Pesquera. 2018. Diario Oficial de la Federación. México, D.F. 11 de Junio del 2018.
- Cartier S, Pellerin J, Fournier M, Tamigneaux E, Girault L, Lemaire N. Use of an index based on the blue mussel (*Mytilus edulis* and *Mytilus trossulus*) digestive gland

weight to assess the nutritional quality of mussel farm sites. *Aquaculture*. 2004; 241:633–654.

Cerenius L, Lee BL, Söderhäll K. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol*. 2008; 29:263–71.

Chikramane PS, Kalita D, Suresh AK, Kane SG, Bellare JR. Nanoparticulate Hypothesis Based on Froth Flotation. *J. Am. Chem. Soc.* 2012a; 28:15864–15875.

Chikramane PS, Kalita D, Suresh AK, Kane SG, Bellare JR. Why extreme dilutions reach non-zero asymptotes: a nanoparticulate hypothesis based on froth flotation. *Langmuir*. 2012b; 28:15864-15875.

Clairborne A. Catalase activity, In: Greenwald RA, (Ed.). *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Boca Raton: CRC Press; 1985. p.283-284.

Coan EV, Scott PV, Bernard FR. *Bivalve Seashell of Western North America Marine Bivalve Mollusks from Artic Alaska to Baja California*. USA: Santa Barbara Museum of Natural History; 2000. 235 p.

Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*. 2005; 21:3674–6.

Cossart P, Helenius A. Endocytosis of Viruses and Bacteria, *CSH Perspect. Biol.* 2014; 6(8):a016972.

Darriba S, Sanjuan F, Guerra A. Energy storage and utilization in relation to the reproductive cycle in the razor clam (Jeffreys, 1865). *ICES J. Mar. Sci.* 2005; 62:886–896.

Davidson DB, Dougherty TJ, Barrett JF, Pucci M. Pharmacogenomics - Is there a role in antibiotic therapy?. *Pharmacogenomics J.* 2002; 2:14–16.

de Almagro MC, Vucic D. The Inhibitor of Apoptosis (IAP) Proteins are Critical Regulators of Signaling Pathways and Targets for anti-Cancer Therapy. *Exp. Oncol.* 2012; 34(3):200-211.

Demangeat JL. NMR wáter proton relaxation in unheated and heated ultrahigh aqueous dilutions of histamine: evidence for an air-dependent supramolecular organization of wáter. *J. Mol. Liq.* 2009; 144:32–39

de Oliveira CC, de Oliveira SM, Goes VM, Probst CM, Krieger MA, Buchi DDF. Gene expression profiling of macrophages following mice treatment with an immunomodulator medication. *J. Cell Biochem.* 2008; 104:1364–77.



- Detree C, Núñez-Acuña G, Roberts S, Gallardo-Escárte C. Uncovering the Complex Transcriptome Response of *Mytilus chilensis* against Saxitoxin: Implications of Harmful Algal Blooms on Mussel Populations. *PlosOne*. 2016; 11(10):e0165231.
- Dias-Neto J, Valladão GMR, Viadanna PHDO, Pilarski F. Homeopathic complex increases survival without affecting the performance of Nile tilapia during masculinization. *J. Appl. Aquaculture*. 2017; 29:33–45.
- Ding X, Jin S, Tong Y, Jiang X, Chen Z, Mei S, Zhang L, Billar TR, Li Q. TLR4 signaling induces TLR3 up-regulation in alveolar macrophages during acute lung injury. *Sci. Rep.* 2017; 7:34278.
- Dong W, Chen Y, Lu W, Wu B, Qi P. Transcriptome analysis *Mytilus coruscus* hemocytes in response to *Vibrio alginolyticus* infection. *Fish Shellfish Immun.* 2017; 70: 560–567.
- Dostert C, Pétrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate Immune Activation Through Nalp3 Inflammasome Sensing of Asbestos and Silica. *Science*. 2008; 320:674–677.
- Drost-Hansen W. Temperature effects on cell-functioning – a critical role fro vicinal water. *Cell Mol. Biol.* 2001; 47:865–883.
- Dubert J, Barja JL, Romalde JL. New Insights into Pathogenic Vibrios Affecting Bivalves Hatcheries: Present and Future Prospects. *Front. Microbiol.* 2017; 8:1-16.
- Elia V, Marrari LA, Napoli E. Aqueous nanostructures in water induced by electromagnetic fields emitted by EDS. A conducto-metric study of fullerene and carbon nanotube EDS. *J. Thermal Anal. Calorim.* 2012; 107:843-851.
- Endler PC, Schulte J, Stock-Schroeer B, Stephen S. “Ultra High Dilution 1994” revisited 2015 – the state of follow up research. *Homeopathy*. 2015; 104:223-6.
- Ertl NG, O’Connor WA, Papanicolaou A, Wiegand AN, Elizur A. Transcriptome Analysis of the Sydney Rock Oyster, *Saccostrea glomerata*: Insights into Molluscan Immunity. *PLoS ONE*. 2016; 11(6):1-33.
- Estrada N, Romero MJ, Campa-Córdova A, Luna A, Ascencio F. Effects of the toxic dinoflagellate, *Gymnodinium catenatum* on hydrolytic and antioxidant enzymes, in tissues of the giant lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 2007; 146: 502-510.
- Estrada N, Velázquez E, Rodríguez-Jaramillo C, Ascencio F. Morphofunctional study of haemocytes from lion-paw scallop *Nodipecten subnodosus*. *Immunol.* 2013; 218:1093-1103.

- Fabbri E, Valbonesi P, Franzellitti S. HSP expression in bivalves. *Invert. Surviv. J.* 2008; 5(2):135-161.
- Ferraz FN, Simoni GK, do Nascimento A, de Melo CS, Aleixo DL, Gomes ML, de Araújo SM. Different forms of administration of biotherapy 7dH in mice experimentally infected by *Trypanosoma cruzi* produce different effects. *Homeopathy.* 2011; 100:237–243.
- FAO. Food and Agriculture Organisation of the United Nations. The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA), Rome: FAO. 2018. 243 p.
- Franchi L, Muñoz-Planillo R, Nuñez G. Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nat. Immunol.* 2012; 13:325-332.
- Freedman AH, Clamp M, Sackton TB. Error, noise and bias in de novo transcriptome assemblies. *BioRxiv [Preprint].* 2019 bioRxiv 585745 [citado 2019 Nov 14]: [44 p.]. Disponible en: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/585745v4>
- Freier E, Wolf S, Gerwert K. Proton transfer via a transient linear water-molecule chain in membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2011; 108:11435-11439.
- Freites L, Fernández-Reiriz MJ, Labarta U. Biochemical composition and energy content of the mussel *Mytilus galloprovincialis* of subtidal and rocky shore origin: Influence of environment variables and source of mussel seed. *Cienc. Mar.* 2003; 29:603-619.
- Galimany E, Sunila I, Hégaret H, Ramón M, Wikfors GH. Experimental exposure of the blue (*Mytilus edulis* L.) to the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense*: Histopathology, immune responses, and recovery. *Harmful Algae.* 2008; 7:702-711.
- Ganguly S, Paul I, Mukhopadhyay SK. Application and Effectiveness of Immunostimulants, Probiotics, and Prebiotics in Aquaculture: A review. *Isr. J. Aquac. Bamid.* 2010; 62:130-138.
- García LRG, Villegas AB. Implicaciones médicas de las investigaciones sobre medicamentos homeopáticos realizadas en la Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar Villa Clara - Cienfuegos. *Rev. Med. Homeopatia.* 2014; 7:55–57.
- Genard B, Miner P, Nicolas JL, Moraga D, Boudry P, Pernet F, Tremblay R. Integrative study of physiological changes associated with bacterial infection in Pacific oyster larvae. *Plos One.* 2013; 8:e64534.
- Gerdol M. Immune-related genes in gastropods and bivalves: a comparative overview. *ISJ.* 2017; 14:95-111.

- Gerdol M, Gomez-Chiarri M, Castillo MG, Figueras A, Fiorito G, Moreira R, Novoa B, Pallavicini A, Ponte G, Roumbedakis K, Venier P, Vasta GR. Immunity in Molluscs: Recognition and Effector Mechanisms, with a Focus on Bivalvia. In: Cooper EL, (Ed.). *Advances in Comparative Immunology*. USA: Springer International Publishing AG; 2018. p. 225-341.
- Gibson DM. *Phosphoricum acidum* a study. *Homeopathy*. 1967; 56:254-257.
- Gill DJ, Teo H, Perisic O, Veprintsev DB, Emr SD, Williams R. Structural insight into the ESCRT-I/II link its role in MVB trafficking. *EMBO J*. 2007; 26(2):600-612.
- Gómez-Chiarri M, Warren WC, Guo X, Proestou D. Developing tools for the study of mollusca immunity: The sequencing of the genome of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Fish Shellfish Immunol*. 2015a; 46:2-4.
- Gómez-Chiarri M, Guo X, Tanguy A, He Y, Proestou D. The use of -omic tools in the study of disease processes in marine bivalve mollusks. *J. Invertebr. Pathol*. 2015b; 131:137–54.
- Gómez-León J, Villamil L, Lemos ML, Nova B, Figueras A. Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from Aquacultured Carpet Shell Clam (*Ruditapes decussatus*) Larvae Associated with Mass Mortalities. *Appl. Environ. Microbiol*. 2005; 71:98–104.
- González-Muñoz MJ, Meseguer I, Sanchez-Reus MI, Schultz A, Olivero R, Benedí J, Sánchez-Muniz FJ. Beer consumption reduces cerebral oxidation caused by aluminium toxicity by normalizing gene expression of tumor necrotic factor alpha and several antioxidant enzymes. *Food Chem Toxicol*. 2008; 46:1111-1118.
- Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Williams TD, Nagaraj SH, Nueda MJ, Robles M, Talón M, Dopazo J, Conesa A. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO. *Nucleic Acids Res*. 2008; 36(10):3420-3435.
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Regev A. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat. Biotechnol*. 2011; 29:644–52.
- Guevara-Escamilla S, Sáenz-Gaxiola LM, García-Hirales R, Tapia-Vázquez OM. Situación actual de los laboratorios de producción comercial de moluscos bivalvos en el Noroeste de México. México: Comité estatal de sanidad acuícola e inocuidad de Baja California, A.C.; 2010. 50p.
- Günther J, Seyfert HM. The first line of defence: insights into mechanisms and relevance of phagocytosis in epithelial cells. *Semin. Immunol*. 2018; 40:555-565.

- Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M, Grabherr M, Blood PD, Bowden J, Couger MB, Eccles D, Li B, Lieber M, MacManes MD, Ott M, Orvis J, Pochet N, Strozzi F, Weeks N, Westerman R, Williams T, Dewey CN, Henschel R, LeDuc RD, Friedman N, Regev A. *De novo* transcript sequence reconstruction from RNA-Seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat. Protoc.* 2013; 8(8): 1494-512.
- Harris J, Werling D, Hope JC, Taylor G, Howard CJ. Caveolae and caveolin in immune cells: distribution and functions. *Trends Immunol.* 2002; 23(3):158-164.
- Hine PM. The inter-relationship of bivalves haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 1999; 9:367-385.
- Hisatsune K, Kondo S, Iguchi T, Machida M, Asou S, Inaguma M, Yamamoto F. Sugar Composition of Lipopolysaccharides of Family Vibrionaceae Absence of 2-keto-3-deoxyoctonate (KDO) except in *Vibrio parahaemolyticus* O6. *Microbiol. Immunol.* 1982; 26(8): 649-664.
- Hong X, Xiang L, Shao J. The immunostimulating effect of bacterial genomic DNA on the innate immune responses of bivalve mussel, *Hyriopsis cumingii* Lea. *Fish Shellfish Immunol.* 2006; 21: 357-364.
- Hu H, Li Q, Jiang L, Zou Y, Duan J, Sun Z. Genome-wide transcriptome analysis of silica nanoparticles-induced toxicity in zebra embryos. *Toxicol. Res.* 2016; 5(2): 609-620.
- Huang Y, Hui K, Jin M, Yin S, Wang W, Ren Q. Two endoplasmic reticulum proteins (calnexin and calreticulin) are involved in innate immunity in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Sci. Rep.* 2016; 6:27578.
- Iryani MTM, MacRae TH, Panchakshari S, Tan J, Bossier P, Wahid MEA, Sung YY. Knockdown of heat shock protein 70 (Hsp70) by RNAi reduces the tolerance of *Artemia franciscana* nauplii to heat and bacterial infection. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2017; 487:106-112.
- Jäger T, Scherr C, Shah D, Majewsky V, Wolf U, Betti L, Baumgartner S. The use of plant-based bioassays in homeopathic basic research. *Homeopathy.* 2015; 104:277-282.
- Jiménez-Dalmaroni MJ, Gerswhin ME, Adamopoulos IE. The critical role of toll-like receptors--From microbial recognition to autoimmunity: A comprehensive review. *Autoimmun. Rev.* 2016; 15(1):1-8.
- Júnior RP, Vargas L, Valentim-Zabott M, Ribeiro RP, da Silva V, Otutumi LK. Morphometry of white muscle fibers and performance of Nile tilapia (*Oreochromis*

*niloticus*) fingerlings treated with methyltestosterone or a homeopathic complex. Homeopathy. 2012; 101:154–8.

Kádár E. Haemocyte response associated with induction of shell regeneration in the deep-sea vent mussel *Bathymodiolus azoricus* (Bivalvia: Mytilidae). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2008; 362:71-78.

Kesarodi-Watson A, Kaspar H, Lategan MJ, Gibson L. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. Aquaculture. 2008; 274:1-14.

Kim Y, Ashton-Alcox KA, Powell EN. Histological Techniques for Marine Bivalve Molluscs: Update. Maryland: NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 27. 2006. 76 p.

Kokornaczyk MA, Würtenberger S, Baumgartner S. Impact of succession on pharmaceutical preparations analyzed by means of patterns from evaporated droplets. Sci. Rep. 2020; 10:570.

Koo IC, Ohol YM, Wu P, Morisaki JH, Cox JS, Brown EJ. Role for lysosomal enzymes  $\beta$ -hexosaminidase in the control of mycobacteria infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008; 105(2):710-715.

Kurtz J, Armitage SAO. Alternative adaptive immunity in invertebrates. Trends Immunol. 2006; 7:493-496.

Laird MH, Rhee SH, Perkins DJ, Medvedev AE, Piao W, Fenton MJ, Vogel SN. TLR4/MyD88/PI3K interactions regulate TLR4. J. Leukoc. Biol. 2009; 85(6): 966-977.

Lawrence R, Jeyakumar E. Antimicrobial Resistance: A Cause for Global Concern. BMC Proc. 2013; 7:S1.

Le Bris C, Richard G, Paillard C, Lambert C, Segueineau C, Gauthier O, Guérard F. Immune responses of phenoloxidase and superoxide dismutase in the manila clam *Venerupis philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis* Part I: Spatio-temporal evolution of enzymes activities post-infection. Fish Shellfish Immunol. 2015; 42:16–24.

Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. BMC Bioinformatics. 2011; 12:323.

Li C, Ni D, Song L, Zhao J, Zhang H, Li L. Molecular cloning and characterization of catalase gene from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. Fish Shellfish Immun. 2008; 24:26-34.

- Li E, Li C. Use of RNA-Seq in Aquaculture Research. *Poultry Fisheries Wildlife Sci.* 2014; 2:2.
- Limin F, Beifang N, Zhengwei Z, Sitao W, Weizhong L. CD-HIT: accelerated for clustering the next generation sequencing data. *Bioinformatics.* 2012; 28(23): 3150-3152.
- Lin T, Xing J, Jiang J, Tang X, Zhan W.  $\beta$ -glucan-stimulated activation of six enzymes in the haemocytes of scallop *Chlamys ferreris* at different water temperatures. *Aquaculture.* 2011; 315:213-221.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method. *Methods.* 2001; 25: 402-408.
- Lobet E, Letesson JJ, Arnould T. Mitochondria: a target for bacteria, *Biochem. Pharmacol.* 2015; 94(3):173-85.
- Lodeiros J, Rengel JJ, Guderley HE, Nusetti O, Himmelman JH. Biochemical composition and energy allocation in the tropical scallop *Lyropecten (Nodipecten) nodosus* during the months leading up to and following the development of gonads. *Aquaculture.* 2001; 1-2:63–72.
- López C, Carballal MJ, Azevedo C, Villalba A. Enzyme characterization of the circulating haemocytes of the carpet shell clam, *Ruditaped decussatus* (Molusca:bivalvia). *Fish Shellfish Immunol.* 1997; 7:595-608.
- López-Bojorque LN. La regulación del factor de transcripción NF-KB. Un mediador molecular en el proceso inflamatorio. *Rev. Invest. Clin.* 2004; 56:83-92.
- López-Carvallo JA, Arcos-Ortega GF, Tovar-Ramírez D, Hernández-Oñate MA, Abasolo-Pacheco F, García-Corona JL, Mazón-Suástegui JM. Effect of immunomodulatory medication over the general response of juvenile Catarina scallop (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842), *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 2019; 47(1):65-77.
- López-Carvallo JA, Mazón-Suástegui JM, Hernández-Oñate MA, Tover Ramírez D, Abasolo-Pacheco F, Morelos-Castro RM, Arcos-Ortega GF. Transcriptome analysis of Catarina scallop (*Argopecten ventricosus*) juveniles treated with highly-diluted immunomodulatory compounds reveals activation of non-self-recognition system, *PlosOne.* 2020; 15(5):e0233064.
- Lucas SJ, Southgate PC. *Aquaculture Farming Aquatic Animals and Plants.* 2th edition. USA: Blackwell Publishing Ltd. 2012. 629 p.
- Luna-González A, Maeda-Martínez AN, Vargas-Albores F, Ascencio-Valle F, Robles-Mungaray M. Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult

plasma and haemocytes of bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol.* 2003; 15:275-282

Luna-González A, Barbosa-Solomieu V, Mendes-De-Bem M. Inmunología y patología microbiana de moluscos bivalvos con énfasis en especies del género *Nodipecten* spp. En: Maeda-Martínez AM, Lodeiros-Seijo C, (Eds). *Biología y Cultivo de los moluscos Pectínidos del Género Nodipecten*. México: Editorial Limusa; 2011. p. 203-215.

Macey BM, Coyne VE. Improved growth rate and disease resistance in farmed *Haliotis midae* through probiotic treatment. *Aquaculture.* 2005; 245:249-261.

Maguire JA, Fleury PG, Burnell GM. Some methods for quantifying quality in the Scallop *Pecten maximus* (L.). *J. Shellfish Res.* 1999; 18:59-66.

Maguire JA, Burnell GM. The effect of stocking density in suspended culture on growth and carbohydrate content of the adductor muscle in two populations of the scallop (*Pecten maximus* L.) in Bantry Bay, Ireland. *Aquaculture.* 2001; 198:95-108.

Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Grima M, Lee WP, Weinrauch Y, Monack DM, Dixit VM. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature.* 2006; 440:228-232.

Mazón-Suástegui JM. *Biología y cultivo de la almeja Catarina Argopecten ventricosus* (Sowerby II, 1842). Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona, España. 2005. 217 p.

Mazón-Suástegui JM, Parres-Haro MA, Ruíz-Ruíz KM, Rodríguez-Jaramillo C, Saucedo PE. Influence of hatchery diets on early grow-out of the Cortez oyster *Crassostrea corteziensis* in Sinaloa, Mexico. *Aquac. Res.* 2009; 40:1908-1914.

Mazón-Suástegui JM, García-Bernal M, Abasolo-Pacheco F, Avilés-Quevedo A, Campa-Córdova AI, Rodríguez-Jaramillo C. Homeopathy for shrimp aquaculture: increased survival and superoxide dismutase activity in juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* during a bacterial pathogen-challenge. *Homeopathy.* 2016a; 105:33.

Mazón-Suástegui JM, Rosero-García A, Avilés-Quevedo A, Dumas S, Vega R, Rodríguez-Jaramillo C. Homeopathy for marine fish aquaculture: Increased growth and survival of juvenile spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Homeopathy.* 2016b; 105:32.

Mazón-Suástegui JM, García-Bernal M, Saucedo PE, Campa-Córdova A, Abasolo-Pacheco F. Homeopathy outperforms antibiotics treatments in juvenile scallop *Argopecten ventricosus*: effects on growth, survival, and immune response. *Homeopathy.* 2017; 106(1):18-26.

- Mazón-Suástegui JM, García-Bernal M, Avilés-Quevedo A, Campa-Córdova AI, Salas-Leiva J, Abasolo-Pacheco F. Assessment of homeopathic medicines on survival and antioxidant response in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Rev. MVZ Cord. 2018a; 23(3):6850-6859.
- Mazón Suástegui JM, Tovar Ramírez D, Salas Leiva JS, Arcos Ortega GF, García Bernal M, Avilés Quevedo MA, López Carvallo JA, García Corona JL, Ibarra García LE, Ortíz Cornejo NL, Teles A, Rosero García A, Abasolo Pacheco F, Campa Cordova AI, Saucedo Lastra PE, Barajas Frias JD, Ormart Castro P, Rodríguez Jaramillo MC, González Gonzáles R, Barajas Ponce U, Tordecillas Guillén JL, Álvarez Gil FA, Pineda Mahr G, Peiro López J, Robles Mungaray M. Aquacultural Homeopathy: A Focus on Marine Species. In: Diarte-Plata G, Escamilla R, (Eds). Aquaculture: Plants and Invertebrates. Croatia: IntechOpen; 2018b. p. 67-91.
- Mazón-Suástegui JM, Salas-Leiva J, Teles A, Tovar-Ramírez D. Immune and Antioxidant Enzyme Response of Longfin Yellowtail (*Seriola rivoliana*) Juveniles to Ultra-diluted Substances Derived from Phosphorus, Silica and Pathogenic Vibrio. Homeopathy. 2019a; 108(1):43-53.
- Mazón-Suástegui JM, Salas-Leiva J, Teles A, Tovar-Ramírez D. Evaluation of Homeopathic Phosphoric Acid, Silica and Pathogenic Vibrio on Digestive Enzymes Activity of Longfin Yellowtail Fish (*Seriola rivoliana*). Homeopathy. 2019b; 108: 43.
- Mazón-Suástegui JM, Tovar-Ramírez D, Ortiz-Cornejo NL, García-Bernal M, López-Carvallo JA, Salas-Leiva JS, Pacheco-Abasolo F. Effect of homeopathic medicines on growth, survival and gastrointestinal microbiota of juvenile scallop *Argopecten ventricosus*. Rev. MVZ Cord. 2019c; 24(3): 7328-7338.
- Mazón-Suástegui JM, Ojeda-Silvera CM, García-Bernal M, Avilés-Quevedo MA, Abasolo-Pacheco F, Batista-Sánchez D, Tovar-Ramírez D, Arcos-Ortega F, Murillo-Amador B, Nieto-Garibay A, Ferrer-Sánchez Y, Morelos-Castro RM, Alvarado-Mendoza A, Díaz-Díaz M, Bonilla-Montalvan B. Agricultural homeopathy: New insights into organic's. In: Moudry J, (Ed.). Multifunctionality and Impacts of Organic and Conventional Agriculture. Croatia: IntechOpen; 2019d. p 1-18.
- Mazón-Suástegui JM, Ojeda-Silvera CM, Agüero-Fernández YM, Batista-Sánchez D., Batista-Sánchez D., García-Bernal M., Abasolo-Pacheco F. Efecto de medicamentos homeopáticos en la germinación y crecimiento inicial de *Salicornia bigelovii* (Torr.). Terra Latinoam. 2020; 30(1): 1-12.
- Meena DK, Das P, Kumar S, Mandal SC, Prusty AK, Singh SK, Mukherjee SC. Beta-glucan: an ideal immunostimulant in aquaculture (a review). Fish Physiol. Biochem. 2013; 39:431–57.



- Mello DF, de Olivera ES, Vieira RC, Simones E, Trevisan R. Cellular and Transcriptional Responses of *Crassostrea gigas* Haemocytes Exposed in Vitro to Brevetoxin (PbTx-2). *Mar. Drugs*. 2012; 10:583-597.
- Merlini LS, Vargas L, Piau R, Ribeiro RP, Merlini NB. Effects of a homeopathic complex on the performance and cortisol levels in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Homeopathy*. 2014; 103:139–42.
- Miao Y, Wu J, Abraham SN. Ubiquitination of Innate Immune Regulator TRAF3 Orchestrates Expulsion of Intracellular Bacteria by Exocyst Complex. *Immunity*. 2016; 45:94-105.
- Mohan K, Ravichandran S, Muralisankar T, Uthayakumar V, Chandirasekar R, Seedevid P, Abirami RG, Rajan DK. Application of marine-derived polysaccharides as immunostimulants in aquaculture: A review of current knowledge and further perspectives. *Fish Shellfish Immun*. 2019; 86: 1177-1193.
- Moore MN. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment. *Environ. Int*. 2006; 32(8):967-976.
- Moreira R, Milan M, Balseiro P, Romero A, Babbucci M, Figueras A, Novoa B. Gene expression profile analysis of Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) hemocytes after a *Vibrio alginolyticus* challenge using an immune-enriched oligo-microarray. *BMC Genomics*. 2014; 15:1–16.
- Moreira R, Balseiro P, Forn-Cuni G, Milan M, Bargelloni L, Novoa B, Figueras A. Bivalve transcriptomic reveals pathogen sequences and a powerful immune response of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Mar. Biol*. 2018; 165: 61.
- Morelos RM, Ramírez JL, García-Gasca A, Ibarra AM. Expression of the Myostatin Gene in the Adductor Muscle of the Pacific Lion-Paw Scallop *Nodipecten subnodosus* in Association With Growth and Environmental Conditions. *J. Exp. Zool*. 2015; 323A:239-255.
- Moretti J, Roy S, Bozec D, Martinez J, Chapman JR, Ueberheide B, Lamming DW, Chen ZJ, Horng T, Yeretssian G, Green DR. STING Senses Microbial Viability to Orchestrate Stress-Mediated Autophagy of the Endoplasmic Reticulum. *Cell*. 2017; 171(4):809-823.
- Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods*. 2008; 5:1–8.
- Mount AS, Wheeler AP, Paradkar RP, Snider D. Hemocyte-Mediated Shell Mineralization in the Eastern Oyster. *Science*. 2004; 304:297-300.

- Moyano DF, Goldsmith M, Solfiell DJ, Landesman-Milo D, Miranda OR, Peer D, Rotello VM. Nanoparticles Hydrophobicity Dictates Immune Response. *J. Am. Chem. Soc.* 2012; 134:3965-3967.
- Muñoz-Ruiz RDC, Castro Portillo MM. Efecto comparativo de la calcarea carbonica, la *Silicea terra* y la avoparcina como promotores del crecimiento en pollos de engorda. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara. México. 1994. 73 p.
- Nagalakshmi U, Waern K, Snyder M. RNA-Seq: A Method for Comprehensive Transcriptome Analysis. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2010; 4:Unit4.11.1-13.
- Novoa B, Costa MM, Prado M, Gestal C, Figueras A. Respuesta inmune de moluscos. En: A. Figueras, B. Novoa. Enfermedades de moluscos bivalvos de interés en acuicultura. España: Fundación OESA; 2011. p. 399 - 441.
- Olioso D, Marzotto M, Bonafini C, Brizzi M, Bellavite P. *Arnica montana* effects on gene expression in a human macrophage cell line. Evaluation by quantitative Real-Time PCR. *Homeopathy.* 2016; 105:131–147.
- Oliveira-Nascimento L, Massari P, Wetzler LM. The role of TLR2 in infection and immunity. *Front. Immunol.* 2012; 3:79.
- Ortiz-cornejo NL, Tovar-Ramírez D, Abasolo-pacheco F, Mazón-Suástegi JM. Homeopatía, una alternativa para la acuicultura. *Rev. Méd. Hom.* 2017; 10: 28-34.
- Oyanedel D, Gonzales R, Brokordt K, Schmitt P, Mercado L. Insight into the messenger role of reactive oxygen intermediates in immunostimulated hemocytes from the scallop *Argopecten ventricosus*. *Dev. Comp. Immunol.* 2016; 65:226-230.
- Phromkunthong W. Effect of silica supplement on growth performance and health condition of juvenile shrimp. *Aqua. Asia Pac.* 2015; 11: 43-46.
- Pipe RK. Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Histochem. J.* 1990; 22:595-603.
- Prado S, Romalde JL, Barja JL. Review of probiotics for use in bivalve hatcheries. *Vet. Microbiol.* 2010; 145:187–197
- Prasad A, Rossi C, Lamponi S, Pospíšil P, Foletti A. New perspective in cell communication: potential role of ultra-weak photon emission. *J. Photochem. Photobiol.* 2014; 139:47–53.
- Prego-Faraldo MV, Vieira LR, Eirin-Lopez JM, Méndez J, Guilhermino L. Transcriptional and biochemical analysis of antioxidant enzymes in the mussel *Mytilus galloprovincialis* during experimental exposures to the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Mar. Environ. Res.* 2017; 129:304–315.

- Qu F, Xiang Z, Zhou Y, Qin Y, Yu Z. Tumor necrosis receptor-associated factor 3 from *Anodonta woodiana* is an important factor in bivalve immune response to pathogen infection. *Fish Shellfish Immunol.* 2017; 71:151-159.
- Ramirez-Ortiz ZG, Specht CA, Wang JP, Lee CK, Bartholomeu DC, Gazzinelli RT, Levitz SM. Toll-like receptor 9-dependent immune activation by unmethylated CpG motifs in *Aspergillus fumigatus* DNA. *Infect. Immun.* 2008; 76:2123–2129.
- Ren Y, Xue J, Yang H, Pan B, Bu W. Transcriptome analysis of *Ruditapes philippinarum* hepatopancreas provides insights into immune signaling pathways under *Vibrio anguillarum* infection. *Fish Shellfish Immun.* 2017; 64: 14-23.
- Rey L. Can low-temperature thermoluminescence cast light on the nature of ultra-high dilutions? *Homeopathy.* 2007; 96:170-174.
- Richard M, Wainshilboum MD, Wang LM. Pharmacogenomics: Precision Medicine and Drug Response. *Mayo. Clin. Proc.* 2017; 92:1711-1722.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.* 2010; 1:139-40.
- Roe JH, Bailey JM, Gray RR, Robinson JN. Complete removal of glycogen from tissues by extraction with cold trichloroacetic acid solution. *J. Biol. Chem.* 1961; 236:1244–1246.
- Romero J, Feijo CG, Navarrete P. Antibiotics in aquaculture – use, abuse, and alternatives. In: Carvalho E, (Ed.). *Health and environmental aquaculture.* Croatia: IntechOpen; 2012. p. 159-198.
- Rosero-García AP, Mazón-Suástegui JM, Dumas S, Chávez-Sánchez MC, Avilés-Quevedo A, Rodríguez-Jaramillo C. Effect of Homeopathic Medicines on Intestinal Coccidia and Immune Response Cell in Spotted Rose Snapper (*Lutjanus guttatus*). *Homeopathy.* 2019; 108(3):201-213.
- Rowley AF, Powell A. Invertebrate Immune System-Specific, Quasi-Specific, or Nonspecific?. *J. Immunol.* 2007; 179:7209-7214.
- Roy R, Singh SK, Das M, Tripathi A, Dwivedi PD. Toll-like receptor 6 mediated inflammatory and functional responses of zinc oxide nanoparticles primed macrophages. *Immunology.* 2014; 142(3):453-464.
- Sá ACC, Sadee W, Johnson JA. Whole Transcriptome Profiling: An RNA-Seq Primer and Implications for Pharmacogenomics Research. *Clin. Transl. Sci.* 2017; 00:1-9.

- Saha SK, Roy S, Khuda-bukhsh AR. Evidence in support of gene regulatory hypothesis : Gene expression profiling manifests homeopathy effect as more than placebo. *Int. J. High Dilution Res.* 2013; 12:162–167.
- Sahay G, Alakhova DY, Kabanov AV. Endocytosis of Nanomedicines, *J. Control. Release.* 2010; 145(3):182-195.
- Sarkar SA, Kutlu B, Velmurugan K, Kizak-Kondoh S, Lee CE, Wong R, Valentine A, Davidson HW, Hutton JC, Pugazhenthii S. Cytokine-mediated induction of anti-apoptotic genes that are linked to nuclear factor kappa-B (NF- $\kappa$ B) signalling in human islets and in mouse beta cell line. *Diabetología.* 2009; 52:1092-1101.
- Scherer-Pongratz W, Endler PC, Lothaller H, Stephen S. Wheat and ultra high diluted silver nitrate – further experiments and re-analysis of data. *Homeopathy.* 2015; 104:246-249.
- Schmidt O, Teis D. The ESCRT machinery. *Curr. Biol.* 2012; 22(4):PR116-R120.
- Schmieder R, Edwards R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics.* 2011; 27: 863-864.
- Secretaría de Salud. Farmacopea homeopática de los Estados Unidos Mexicanos. FEUM-SSA. Biblioteca Nacional de México 615.532-scdd21. 2015. ISBN: 978-607-460-509-9.
- Silva AL, Peres C, Conriot J, Matos AI, Moura L, Carreira B, Sainz V, Scomparin A, Satchi-Fainaro R, Pr at V, Florido HF. Nanoparticles impact in innate immune cell pattern-recognition receptors and inflammasomes activation. *Semin. Immunol.* 2017; 34:3-24.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem.* 1985; 150: 76–85.
- Smith-Unna RD, Bournnell C, Patro R, Hibberd JM, Kelly S. TransRate: reference free quality assessment of de-novo transcriptome assemblies. *Genome Res.* 2016; 26:1134-1144.
- Sobrino-Figueroa AS, C aceres-Mart inez C. Evaluation of the effects of metals Cd, Cr, Pb and their mixture on the filtration and oxygen consumption rates in Catarina scallop, *Argopecten ventricosus* juveniles. *J. Environ. Biol.* 2014; 35:1-8.
- S oderh all K, Cerenius L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 1998; 10:23-28.

- Song L, Wang L, Qui L, Zhang H. CHAPTER 3: BIVALVE IMMUNITY. In: Söderhäll K, (Ed.). *Invertebrate Immunity*. USA: Landes Bioscience and Springer Science+Business Media; 2010. p. 44-65.
- Sukul NC, Ghosh S, Sukul A, Sinhababu SP. Variation in fourier transform infrared spectra of some homeopathic potencies and their diluent media. *J. Altern. Complement. Med.* 2005; 11: 807-812.
- Sverdlov M, Shajahan AN, Minshall RD. Tyrosine phosphorylation-dependence of caveolae-mediated endocytosis. *J. Cell. Mol. Med.* 2007; 11(6):1239-1250.
- Tarr JM, Young PJ, Morse R, Shaw DJ, Haigh R, Petrov PG, Johnson SJ, Winyard PG, Eggleton P. A mechanism of release of calreticulin from cells during apoptosis. *J. Mol. Biol.* 2010; 401(5): 799-812.
- Tatematsu M, Nishikawa F, Seya T, Matsumoto M. Toll-like receptor 3 recognizes incomplete stem structures in single-stranded viral RNA. *Nat. commun.* 2013; 4:1833.
- Tello-Olea M, Rosales-Mendoza S, Campa-Córdova AI, Palestino G, Luna-González A, Reyes-Becerril M, Velazquez E, Hernandez-Adame L, Angulo C. Gold nanoparticles (AuNP) exert immunostimulatory and protective effects in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 2019; 84:756-767.
- Thomas Y, Schiff M, Belkadi L, Jurgens P, Kahhak L, Benveniste J. Activation of human neutrophils by electronically transmitted phorbol-myristate acetate. *Med. Hypotheses.* 2000; 54:33-39.
- Tran ST, Bowman ME, Smith TK. Effects of a silica-based feed supplement on performance, health, and litter quality of growing turkeys. *Poult Sci.* 2015; 94:1902–8.
- Travers M, Boettcher K, Roque A, Friedman CS. Bacterial diseases in marine bivalves. *J. Invertebr. Pathol.* 2015; 131:11–31.
- Trebbi G, Dinelli G, Marotti I, Bregola V, Benni A, Betti L. Effects of homeopathic treatments on strawberry plants in field. *Homeopathy.* 2014; 103:92–93.
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40(15): e115.
- Upadhyay RP, Nayak C. Homeopathy emerging as nanomedicine. *Int. J. High Dilution Res.* 2011; 10:299–310.

- Uriarte I, Rupp G, Abarca A. Producción de Juveniles Pectínidos Iberoamericanos Bajo Condiciones Controladas. Maeda-Martínez, A. N. (ed.). Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura. México: LIMUSA; 2001; 147-171 pp.
- Urra H, Henriquez DR, Cánovas J, Villarroel-Campos D, Carreras Sureda A, Pulgar E, Molina E, Hazari YM, Lima CM, Alvarez-Rojas S, Figueroa R, Vidal RL, Rodriguez DA, Rivera CA, Court FA, Couve A, Qi L, Chevet E, Akai R, Iwawaki T, Concha ML, Glavic A, Gonzalez-Billault C, Hetz C. IRE1 $\alpha$  governs cytoskeleton remodelling and cell migration through a direct interaction with filamin A. *Nat. Cell Biol.* 2018; 20:942–953.
- Van Wijk R, Bosman S, Van Wijk EP. Thermoluminescence in ultra-high dilution research. *J. Altern. Complement. Med.* 2006; 12:437-443.
- Vandesompele J, Preter KD, Poppe B, Roy NV, Paepe AD. Accurate normalization of real-time quantitative RT -PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Mol. Cell Proteomics.* 2002; 12:2354-2369.
- Vargas-Albores F, Barracco MA. Mecanismos de Defensa de los Moluscos Bivalvos, con Énfasis en Pectínidos. En: Maeda-Martínez, A. N. (ed.). Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura. México: LIMUSA. 2001. p. 127-146.
- Venier P, Domeneghetti S, Sharma N, Pallavicini A, Gerdol M. Immune-Related Signaling in Mussel and Bivalves. In: Ballarin L, Cammarata M, (Eds.). *Lessons in Immunity: From Single-Cell Organisms to Mammals.* USA: Academic Press; 2016. p. 93-105.
- Ventoso P, Pazos AJ, Pérez-Parallé ML, Blanco J, Triviño JC, Sánchez JL. RNA-Seq Transcriptome Profiling of the Queen Scallop (*Aequipecten opercularis*) Digestive Gland after Exposure to Domic Acid-Producing Pseudo-nitzschia. *Toxins.* 2019; 11:19.
- Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullou MJ, Valavanidis A. Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Mar. Pollut. Bull.* 2007; 54:1361-1371.
- Vogel C, Marcotte EM. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat. Rev. Genet.* 2012; 13(4):227-232.
- Wang K, del Castillo C, Corre E, Espinosa EP, Allam B. Clam focal and systemic immune responses to QPX infection revealed by RNA-Seq technology. *BMC Genomics.* 2016; 17:146.

- Wang L, Qiu L, Zhou Z, Song L. Research progress on the mollusc immunity in China. *Dev. Comp. Immunol.* 2013; 39:2–10.
- Wang W, Sun J, Liu C, Xue Z. Application of immunestimulants in aquaculture: current knowledge and future perspectives. *Aquac. Res.* 2017; 48:1-23.
- Wang XW, Lv JL, Shi YR, Guo LY. Comparative Transcriptome Analysis Revealed Genes Regulated by Histone Acetylation and Genes Related to Sex Hormone Biosynthesis in *Phytophthora infestans*. *Front. Genet.* 2020; 11:508.
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* 2009; 10:57-63.
- Waterhouse RM, Seppey M, Simão FA, Manni M, Ioannidis P, Klioutchnikov G, Kriventseva EV, Zdobnov EM. BUSCO Applications from Quality Assessments to Gene Prediction and Phylogenomics. *Mol. Biol. Evol.* 2017; 35(3):543-548.
- Wendling CC, Batista FM, Wegner KM. Persistence, seasonal dynamics and pathogenic potential of *Vibrio* communities from pacific oyster hemolymph. *PloS one.* 2014; 9(4):e94256.
- West AP, Shadel GS, Ghosh S. Mitochondria in innate immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 2011; 11:389-402.
- Xie C, Mao X, Huang J, Ding Y, Wu J, Dong S, Kong L, Gao G, Li CY, Wei L. KOBAS2.0: a web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39:W316-W322.
- Xie P. TRAF molecules in cell signaling and human diseases. *J. Mol. Signal.* 2013; 8:7.
- Yue J, Huhn S, Shen Z. Complex roles of filamin-A mediated cytoskeleton network in cancer progression. *Cell Biosci.* 2013; 3(1):7.
- Zaas DW, Swan Z, Brown BJ, Wright JR, Abraham SN. The expanding roles of caveolin proteins in microbial pathogenesis. *Commun. Integr. Biol.* 2009; 2(6):535-537.
- Zähringer U, Lindner B, Inamura S, Heine H, Alexander C. TLR2 – promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity. *Immunobiology.* 2008; 213:205–224.
- Zar JH. *Biostatistical Analysis*. 5th edition. USA: Pearson; 2010. 251 p.
- Zhao X, Duan X, Wang Z, Zhang W, Li Y, Jin C, Xiong J, Li C. Comparative transcriptome analysis of *Sinonovacula constricta* in gills and hepatopancreas in response to *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Fish Shellfish Immunol.* 2017; 67:523-535.

- Zheng Y, Zhao L, Gao J, Fei Z. iAssembler: a package for de novo assembly of Roche-454/Sanger transcriptome sequences. *BMC Bioinformatics*. 2011; 12: 453.
- Zhu J, Yu D, Zeng X, Zhou K, Zhan X. Recepto-mediated Endocytosis Involves Tyrosine Phosphorylation of Cortactin, *J. Biol. Chem*. 2007; 282:16086-16094.