



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**RESPUESTA GÉNICA DEL OSTIÓN AMERICANO
Crassostrea virginica (GMELIN, 1791) A COMPUESTOS
BIOACTIVOS ALTAMENTE DILUIDOS (CBAD) Y
ACTINOMICETOS PROBIÓTICOS (ACTIN).**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

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

P r e s e n t a

Carlos Samuel Hernández Villasana

La Paz, Baja California Sur, agosto de 2023.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 14:01 horas del día 21 del Mes de agosto del 2023, 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:

" Respuesta génica del ostión Americano *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) a Compuestos Bioactivos Altamente Diluidos (CBAD) y Actinomicetos Probióticos (ACTIN)"

Presentada por el alumno:

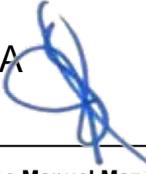
Carlos Samuel Hernández Villasana

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

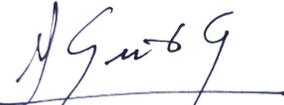
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA


Dra. Fabiola Guadalupe Arcos Ortega
Co-Director de Tesis


Dr. Jose Manuel Mazón Suástegui
Co-Director de Tesis

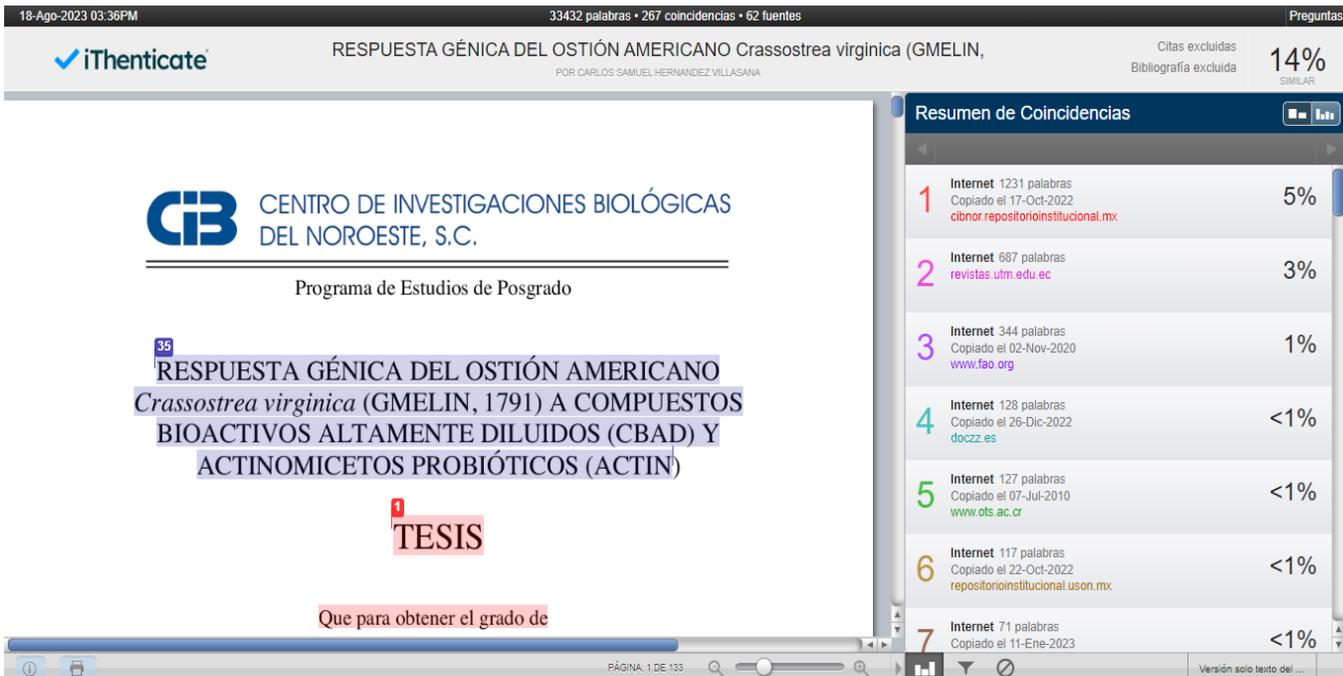

Dr. Jesús Antonio López Carvalho
Co-Tutor


Dra. Alejandra Nieto Garibay,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos.

La Paz, Baja California Sur, a 15 de agosto de 2023.

Los miembros del comité de tesis del estudiante CARLOS SAMUEL HERNÁNDEZ VILLASANA del Programa de Maestría en Uso, Manejo y Preservación de Recursos Naturales con orientación en Acuicultura, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio:
iThenticate
- Filtros utilizados:
Excluir citas y bibliografía.
- Porcentajes de similitud:
14%



18-Ago-2023 03:36PM 33432 palabras • 267 coincidencias • 62 fuentes Preguntas

iThenticate RESPUESTA GÉNICA DEL OSTIÓN AMERICANO *Crassostrea virginica* (GMELIN, Citas excluidas Bibliografía excluida **14%** SIMILAR POR CARLOS SAMUEL HERNANDEZ VILLASANA

Resumen de Coincidencias

Rank	Source	Words	Percentage
1	Internet	1231 palabras Copiado el 17-Oct-2022 cibnor.repositorioinstitucional.mx	5%
2	Internet	687 palabras revistas.utm.edu.ec	3%
3	Internet	344 palabras Copiado el 02-Nov-2020 www.fao.org	1%
4	Internet	128 palabras Copiado el 26-Dic-2022 doczz.es	<1%
5	Internet	127 palabras Copiado el 07-Jul-2010 www.ots.ac.cr	<1%
6	Internet	117 palabras Copiado el 22-Oct-2022 repositorioinstitucional.uson.mx	<1%
7	Internet	71 palabras Copiado el 11-Ene-2023	<1%

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL NOROESTE, S.C.
Programa de Estudios de Posgrado

RESPUESTA GÉNICA DEL OSTIÓN AMERICANO *Crassostrea virginica* (GMELIN, 1791) A COMPUESTOS BIOACTIVOS ALTAMENTE DILUIDOS (CBAD) Y ACTINOMICETOS PROBIÓTICOS (ACTIN)

TESIS

Que para obtener el grado de

PÁGINA: 1 DE 133 Versión solo texto del ...

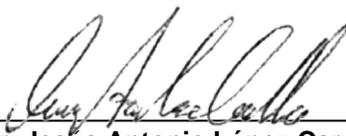
Firmas del comité



Dra. Fabiola Guadalupe Arcos Ortega



Dr. José Manuel Mazón Suástegui



Dr. Jesús Antonio López Carvallo

Conformación de Comités

Comité Tutorial

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

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

Dr. Jesús Antonio López Carvallo
Universidad Católica del Norte, Coquimbo, Chile.
Co-Tutor de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega
Dr. José Manuel Mazón Suástegui
Dr. Jesús Antonio López Carvallo

Jurado de Examen

Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega
Dr. José Manuel Mazón Suástegui
Dr. Jesús Antonio López Carvallo

Suplente

Dra. María del Carmen Rodríguez Jaramillo

Resumen

El ostión americano *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) es una especie ecológica y económicamente importante en la costa atlántica de EUA y en el Golfo de México, y representa el 80 % de la producción de ostreidos en México. El recurso ha mostrado una disminución substancial asociada a contaminación, sobrepesca y enfermedades, de manera que la acuicultura es una alternativa para producción y repoblamiento. Mejorar la respuesta inmune y el desarrollo gonádico mediante estrategias eco-amigables, es vital para la ostricultura. Estudios previos demuestran que la aplicación de Compuestos Bioactivos Altamente Diluidos (CBAD) y/o de Actinomicetos probióticos (ACTIN), induce respuestas medibles a nivel fisiológico, histológico, genómico y transcriptómico, que favorecen crecimiento, supervivencia, maduración sexual y respuesta inmune en peces (*Seriola rivoliana*; *Lutjanus guttatus*), crustáceos (*Penaeus vannamei*) y moluscos bivalvos (*Argopecten ventricosus*, *Crassostrea sikamea*, *Crassostrea corteziensis* y *Crassostrea gigas*). En la presente investigación se estudió el efecto individual y sinérgico de los CBAD (ViP-6C, PhA-6C y SiT-6C) y la cepa RL8 del actinomiceto probiótico *Streptomyces sp* (ACTIN) en adultos reproductores de ostión Americano *C. virginica* cultivados en el laboratorio ostrícola comercial del Centro Ostrícola Tecnológico de Tabasco (COTET), que produce semillas de esta especie en el Golfo de México. Mediante qPCR se evaluó la expresión de genes asociados al sistema inmune y maduración gonádica, particularmente lectina tipo C, glutathion S- transferasa, vitelogenina y AF2. Con histología e histoquímica convencional, se caracterizaron los estadios de madurez sexual, la frecuencia de tipos de ovocitos y algunos indicadores de calidad gonádica como el diámetro teórico de ovocitos, el contenido de triglicéridos y fosfolípidos en gónada, y algunos indicadores de condición nutricional como la altura de túbulos digestivos y el índice de la glándula digestiva (IGD). Adicionalmente, se cuantificó el número de hemocitos, que son las células de la hemolinfa más importantes en la respuesta inmune de los moluscos bivalvos marinos. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión del gen de lectina (asociado a respuesta inmune) y del gen de vitelogenina (relacionado con maduración gonádica de hembras). Los CBAD estimularon el desarrollo gonádico y respuesta inmune de los reproductores. La Cepa RL8 (ACTIN), promovió una mayor cobertura de la glándula digestiva, mayor altura de los túbulos digestivos, mayor número de hemocitos, y un mayor contenido de triglicéridos en gónada.

Palabras clave: *Crassostrea virginica*, CBAD, respuesta inmune, *Streptomyces sp.* RL8, lectina, vitelogenina.

ORCID:0000-0001-5466-0168

Dr. José Manuel Mazón Suástegui

Vo. Bo. Co-Directores de Tesis

Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega

Summary

The American oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) is an ecologically and economically important species on the US Atlantic coast and in the Gulf of Mexico and represents 80 % of the oyster production in Mexico. The resource has shown a substantial decrease associated with pollution, overfishing, and diseases so aquaculture is an alternative for production and repopulation. Improving the immune response and gonadal development through eco-friendly strategies is vital for oyster farming. Previous studies show that the individual application of Highly Dilute Bioactive Compounds (HDBC) and Actinomycete probiotics (ACTIN) induce measurable responses at the physiological, histological, genomic, and transcriptomic levels, which favor growth, survival, sexual maturation, and immune response in fish (*Seriola rivoliana*; *Lutjanus guttatus*), crustaceans (*Penaeus vannamei*) and bivalve mollusks (*Argopecten ventricosus*, *Crassostrea sikamea*, *Crassostrea corteziensis*, and *Crassostrea gigas*). In the present investigation, the individual and synergistic effect of HDBC (VIP-6C, PhA-6C, and SiT-6C) and the probiotic actinomycete strain RL8 derived from *Streptomyces* sp. (ACTIN) was studied on breeding adults of American oyster *C. virginica* cultivated in the commercial oyster culture laboratory of the Centro Ostrícola Tecnológico de Tabasco (COTET), which produces seeds of this species in the Gulf of Mexico. Using qPCR, the expression of genes associated with the immune system and gonadal maturation was evaluated, particularly genes, type C lectin, glutathione S-transferase, vitellogenin, and AF2. Histology and conventional histochemistry were used to characterize the stages of sexual maturity, the frequency of types of oocytes, and some indicators of gonadal quality such as the theoretical diameter of oocytes, the amount of triglycerides and phospholipids in the gonad, and some indicators of nutritional condition such as the height of digestive tubules and the index of the digestive gland (IDG). Additionally, the number of hemocytes, which are the most important hemolymph cells in the immune response of marine bivalve mollusks, was quantified. Statistically significant differences were found in the expression of the lectin gene (associated with immune response) and the vitellogenin gene (related to gonadal maturation of females). The HDBC stimulated the gonadal development and immune response of the breeders. Strain RL8 (ACTIN) promoted a greater coverage of the digestive gland, a greater height of the digestive tubules, a greater number of hemocytes, and a greater content of triglycerides in the gonad.

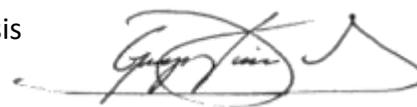
Keywords: *Crassostrea virginica*, CBAD, immune response, *Streptomyces* sp. RL8, lectin gene, vitellogenin gene.

ORCID:0000-0001-5466-0168



Dr. José Manuel Mazón Suástegui

Vo. Bo. Co-Directores de Tesis



Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega

Dedicatoria

Este trabajo de investigación se lo dedico a Dios, por ser mi fuerza, mi sustento y motor inspirador para continuar en esta aventura llamada vida mortal y progresar en lo académico hasta obtener uno de mis anhelos deseados “Ciencia por el bien de la humanidad”.

A mis padres, le agradezco sus sacrificios, desvelos y fe, en este su hijo, sé que sin ustedes yo no podría ser lo que soy hoy.

Querida Dra. Fabiola, gracias por su paciencia, por sus palabras de guía, inspiración y por el interés que ha mostrado en este alumno perdido en la aventura de la ciencia, gracias por el apoyo a mis metas y a sus consejos en la elaboración de los diferentes documentos científicos, y gracias por su amistad, y brindo por una larga amistad, dios la bendiga.

A mi buen Dr. Mazón, por sus enseñanzas, guía y apoyo en la incursión de un tema maravilloso, con un amplio potencial, por las noches de convivencia y los taquitos tan ricos que me ha compartido, gracias por su amistad, un brindis por una larga amistad y aventura en el camino de la ciencia.

A usted Dr. López, por su paciencia en las clases de bioinformática por su orientación en el desarrollo del análisis de datos y su guía en la aventura de los CBAD, dios le bendiga en esta obra llamada ciencia y vida.

Esta obra también es dedicada a mi conyugue con quien he decidido pasar la eternidad juntos y de la mano; caminando por el fantástico sendero de la vida mortal.

.....con toda mi caridad a esa gran mujer y artista.

Mónica Guadalupe Aviña Corral.

Buscad diligentemente y enseñaos el uno al otro, palabras de sabiduría; si, buscad palabras de sabiduría de los mejores libros; buscad conocimiento, tanto por el estudio como por la fe. (D Y C. 88: 118).

Agradecimientos

Agradezco a CONAHCYT por la beca de manutención (No. BECA-803301) y al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR) por permitirme trabajar en sus instalaciones la presente investigación.

Al personal de la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos, a sus Directoras la Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro y Dra. Alejandra Nieto Garibay, a la Mtra. Osvelia Ibarra Morales, a Tania Verónica Núñez Valdez, a la M.C. Ana María Talamantes Cota y al Lic. Horacio Sandoval Gómez.

Gracias a los investigadores y técnicos del Laboratorio de Histología e Histoquímica (CIBNOR): Dra. María del Carmen Rodríguez Jaramillo y a la Lic. Eulalia Meza Chávez. AL Dr. Martin Ramírez-Orozco del Laboratorio de Inmunogenómica Marina del CIBNOR y a la Dra. Milagros García Bernal.

Al personal del Centro Ostrícola Tecnológico del Estado de Tabasco (COTET), por su apoyo colaboración y entrega en este proyecto.

A mis Co-Directores de Tesis: a la Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega y al Dr. José Manuel Mazón Suástegui, quienes me apoyaron en aspectos académicos y dirección en esta investigación, así como en aspectos económicos para mi asistencia a congresos y cursos de capacitación.

Al Dr. Jesús Antonio López Carvallo, por su capacitación en la incursión de la bioinformática, su dirección y asesoría que enriquecieron mi investigación de maestría. Especialmente por ayudar en mi crecimiento profesional con sus enseñanzas.

A los compañeros y familiares que apoyaron al desarrollo de este proyecto de maestría, así como mi agradecimiento por su acompañamiento de esta aventura que me permitió la bendición de colaborar con maravillosos seres, enriqueciendo en gran medida mi tesis de maestría, permitiendo aumentar mi amor y cariño por el trabajo en equipo, no cabe duda de que la multidisciplinariedad resuelve las grandes incógnitas del mundo actual.

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	v
Listado de figuras	vii
Listado de tablas	xi
Abreviaturas	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Características biológicas de <i>Crassostrea virginica</i>	4
2.2 Pesquería de <i>Crassostrea virginica</i> en México.....	6
2.3 Acuicultura de <i>Crassostrea virginica</i>	8
2.3.1 Producción de semillas de <i>Crassostrea virginica</i>	9
2.4 Problemáticas en el cultivo de <i>Crassostrea virginica</i>	14
2.5 Reproducción de <i>Crassostrea virginica</i>	16
2.5.1 Almacenamiento de nutrientes en moluscos bivalvos.....	16
2.5.2 Desarrollo gonádico y vitelogénesis en <i>Crassostrea spp.</i>	17
2.5.3 Indicadores de calidad ovocitaria y reproductiva.....	20
2.6 Sistema inmunitario de moluscos bivalvos.....	22
2.7 Compuestos Bioactivos Altamente Diluidos (CBAD).....	27
2.7.1 Interacciones de los CBAD con los sistemas biológicos.....	29
2.7.2 Efecto de los CBAD en organismos de cultivo	35
2.8 Efecto de actinomicetos probióticos marinos en organismos de cultivo acuícola	39
2.9 Tecnologías moleculares para estudiar los efectos y mecanismos de acción de los CBAD	40
3. JUSTIFICACIÓN	41
4. HIPÓTESIS	42
5. OBJETIVOS	43
5.1 Objetivo general.....	43
5.2 Objetivos particulares.....	43
6. MATERIAL Y MÉTODOS	44

6.1 Organismos experimentales y condiciones de cultivo.....	44
6.2 Diseño experimental.....	45
6.3 Análisis histológico	48
6.4 Indicadores de condición gonádica.....	48
6.4.1 Frecuencia de ovocitos por tratamiento	48
6.4.2 Diámetro teórico de ovocitos (DT).....	48
6.4.3 Relación núcleo/citoplasma de ovocitos (N/C)	49
6.4.4 Cuantificación histoquímica de triglicéridos y fosfolípidos	49
6.5 Indicadores de condición fisiológica general	50
6.5.1 Índice de la glándula digestiva (IGD)	50
6.5.2 Altura de los túbulos digestivos	50
6.6 Indicador de respuesta inmune.	50
6.6.1 Conteo de hemocitos.....	50
6.7 Expresión relativa de genes.....	51
6.7.1 Extracción de ARN total	51
6.7.2 Síntesis de ADN complementario (ADNc)	52
6.7.3 Cuantificación de expresión génica (qPCR).....	53
6.8 Análisis estadísticos	55
7. RESULTADOS	57
7.1 Estadios de desarrollo gonádico	57
7.2 Frecuencia de ovocitos por tratamiento	63
7.3 Triglicéridos y Fosfolípidos	64
7.4 Diámetro teórico y relación núcleo/citoplasma (N/C).....	68
7.5 Área de cobertura de la glándula digestiva de hembras.....	69
7.6 Altura de los túbulos digestivos.....	70
7.7 Conteo de hemocitos.....	71
7.8 Extracción de ARN total y Síntesis de ADNc.....	74
7.9 Expresión relativa de genes asociados a la respuesta inmune	75
7.10 Expresión relativa de genes asociados al proceso reproductivo.....	77
8. DISCUSIÓN	80
9. CONCLUSIONES.....	86
10. LITERATURA CITADA.....	87

Listado de figuras

Figura 1.- Distribución geográfica de <i>Crassostrea virginica</i> en los principales países productores. Mapa realizado con datos georreferenciados de localización reportados para la especie. Fuente: GBIF Backbone Taxonomy. Fecha de consulta 24/08/2022.	4
Figura 2.- Características morfológicas externas de las conchas del ostión Americano <i>Crassostrea virginica</i> (Gmelin, 1791). Fuente: FAO Fisheries & Aquaculture – Programa de información de especies acuáticas. Fecha de consulta: 18/08/2022. https://www.fao.org/fishery/docs/DOCUMENT/aquaculture/CulturedSpecies/file/es/es_crassostreavirginica.htm	6
Figura 3.- Datos de extracción de ostión americano <i>Crassostrea virginica</i> . Fuente: Plataforma ACUASESOR: https://acuasesor.conapesca.gob.mx/anuario.php . Fecha de consulta: 07/09/2022.	7
Figura 4.- Ciclo natural de vida del ostión. Ovulo fecundado (1), división del ovulo (2), larva trocófora (3), larva véliger de charnela recta (4), larva véliger umbada madura (5), larva pedivéliger oculada competente para fijación (6), ostión completamente desarrollado (7). Fuente: Tomado y modificado de Ikenowe y Kafuku (1992).	12
Figura 5.- Imágenes histológicas que muestran los estadios de desarrollo gonádico de hembras de <i>C. gigas</i> , <i>C. Cortezensis</i> y <i>C. virginica</i> . SI (gametogénesis inicial o previtelogénesis), SII (gametogénesis avanzada o vitelogénesis), SIII (madurez o postvitelogénesis), SIV (desove), SV (postdesove o reposo) de <i>C. gigas</i> , PVO (ovocitos previtelogenicos), VO (ovocitos vitelogenicos), CT (tejido conectivo). <i>C. cortezensis</i> y <i>C. virginica</i> , egr (concentración de gametos residuales), f (folículos), fv (folículo vacío), gnf (gameto no funcional), gr (gameto residual), op (ovocito primario), om (ovocito maduro), pf (pared folicular), pfr (pared folicular rota), tc (tejido conectivo), n (núcleo). Tomado de Ezgeta et al. (2020); Góngora et al. (2020); Zamora et al. (2003).	21
Figura 6.- Esquema ilustrativo de las cascadas de señalización para modular la respuesta inmune en moluscos bivalvos. Tomado de Escoubas et al. (2016).....	26
Figura 7.- A. Detección de lectina de mucosito de <i>Crassostrea virginica</i> (CvML; flechas) que recubren el epitelio del manto, mediante hibridación in situ, utilizando sondas de ARNc específicas. B. Determinación de la expresión relativa de CvML (escala logarítmica, normalizada a 18S) en diferentes órganos por qRT-PCR después de la exposición a <i>Vibrio alginolyticus</i> (*) indica una expresión significativamente mayor (prueba t, $p < 0.05$). Tomado de Allam y Pales (2015).	26
Figura 8.- Diagrama ilustrativo del proceso de elaboración de los compuestos bioactivos altamente diluidos (CBAD). Tintura madre (TM): concentrado original del compuesto a partir del cual se realizan diluciones seriales alternadas con agitación o sucusión.	29
Figura 9.- Diagrama hipotético propuesto por Bellavite et al. (2014) para explicar la interacción de medicamentos homeopáticos (CBAD) con los sistemas biológicos: (A) interacción molécula-receptor de membrana; (B) interacción de resonancia electromagnética; (C) regulación biofísica de la respuesta de los receptores de membrana.	30
Figura 10.- Modelo de interacción entre nanopartículas de plata y agua (solvatación). Fuente: Cataliotti et al. (2009).....	32
Figura 11.- Modelo general de la interacción de una nanopartícula con una molécula de agua, generando el proceso de solvatación. Fuente: Kim y Yeom, (2014).....	32

Figura 12.- Complejo nanopartícula-corona en un entorno biológico. Fuente: Monopoli et al. (2012), [Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials].....	33
Figura 13.- Vías de captación de nanopartículas por endocitosis. Fuente: Donahue et al. (2019), [Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine].....	35
Figura 14.- Efecto de CBAD sobre diferentes biomarcadores regulados y evaluados en diversos tejidos de organismos marinos tratados profilácticamente con CBAD. Fuente: Tomado y modificado de López-Carvallo et al. (2021).	37
Figura 15.- Condiciones experimentales en el área de acondicionamiento gonádico de reproductores de <i>Crassostrea virginica</i> en el Centro Ostrícola Tecnológico de Tabasco (COTET).	45
Figura 16.- Imágenes histológicas a 200X (tinción Hematoxilina-Eosina) de las diferentes etapas del desarrollo gonádico en hembras de <i>Crassostrea virginica</i> . S0 = Indiferenciado, S1 = Previtelogénesis o Gametogénesis inicial, SII = Vitelogénesis o Gametogénesis avanzada, SIII = Postvitelogénesis o Madurez, SIV = Desove parcial, SV = Post-desove. 200X barra de escala=100 μm , 400X barra de escala= 50 μm y 1000X barra de escala= 10 μm . Abreviaciones: ccg= capa de células germinales, tcv= tejido conectivo vesicular, lg= línea germinal, cg= células germinales, op= ovocitos previtelogénicos, ov= ovocitos vitelogénicos, og= oogonia, n= núcleo, nc= nucléolo, O-post= ovocitos postvitelogénicos, ec= epitelio ciliado, gd= gonoductos, h= hemocitos.....	59
Figura 17.- Frecuencia (%) de estadios de desarrollo gonádico de hembras de <i>Crassostrea virginica</i> al inicio y final del bioensayo experimental. M0 : Muestreo inicial, T1 : RL8, T2 : ViP 6C +ViA 6C, T3 : PhA 6C+SiT 6C, T4 : ViP 6C+ViA 6C+RL8, T5 : PhA 6C+SiT 6C+RL8, T6 : (Control positivo) alcohol de uso homeopático, T7 : (Control negativo) agua destilada.	61
Figura 18.- Frecuencia (%) de desarrollo gonádico de machos de <i>Crassostrea virginica</i> , al inicio y final del bioensayo experimental. M0 : Muestreo inicial, T1 : RL8, T2 : ViP 6C +ViA 6C, T3 : PhA 6C+SiT 6C, T4 : ViP 6C+ViA 6C+RL8, T5 : PhA 6C+SiT 6C+RL8, T6 : (Control positivo) alcohol de uso homeopático, T7 : (Control negativo) agua destilada.	63
Figura 19.- Frecuencia (%) de ovocitos de hembras de <i>Crassostrea virginica</i> al inicio y final del bioensayo experimental. M0 : Muestreo inicial, T1 : RL8, T2 : ViP 6C +ViA 6C, T3 : PhA 6C+SiT 6C, T4 : ViP 6C+ViA 6C+RL8, T5 : PhA 6C+SiT 6C+RL8, T6 : (Control positivo) alcohol de uso homeopático, T7 : (Control negativo) agua destilada.	64
Figura 20.- Porcentaje de triglicéridos en ovocitos de hembras de <i>Crassostrea virginica</i> , al inicio y final del bioensayo experimental. M0 : Muestreo inicial, T1 : RL8, T2 : ViP 6C +ViA 6C, T3 : PhA 6C+SiT 6C, T4 : ViP 6C+ViA 6C+RL8, T5 : PhA 6C+SiT 6C+RL8, T6 : (Control positivo) alcohol de uso homeopático.	65
Figura 21.- Porcentaje de fosfolípidos en ovocitos de hembras de <i>Crassostrea virginica</i> , al inicio y final del bioensayo experimental. M0 : Muestreo inicial, T1 : RL8, T2 : ViP 6C +ViA 6C, T3 : PhA 6C+SiT 6C, T4 : ViP 6C+ViA 6C+RL8, T5 : PhA 6C+SiT 6C+RL8, T6 : (Control positivo) alcohol de uso homeopático.	66
Figura 22.- Fotografías histológicas de cortes de gónada de hembras <i>Crassostrea virginica</i> con tinción histoquímica de Sudan negro. Tonos negro-azules corresponden a triglicéridos; tonos grises corresponden a fosfolípidos. T1 : RL8, T2 : ViP 6C +ViA 6C, T3 : PhA 6C+SiT 6C, T4 : ViP 6C+ViA 6C+RL8, T5 : PhA 6C+SiT 6C+RL8, T6 : (Control positivo) alcohol de uso homeopático. Imagen 400X; Barra de escala= 50 μm	67
Figura 23.- Diámetro teórico (μm) de ovocitos de hembras de <i>Crassostrea virginica</i> . al inicio y	

- final del bioensayo experimental. **M0**: Muestreo inicial, **T1**: RL8, **T2**: ViP 6C +ViA 6C, **T3**: PhA 6C+SiT 6C, **T4**: ViP 6C+ViA 6C+RL8, **T5**: PhA 6C+SiT 6C+RL8, **T6**: (Control positivo) alcohol de uso homeopático, **T7**: (Control negativo) agua destilada.68
- Figura 24.-** Relación núcleo/citoplasma (N/C) de ovocitos de hembras de *Crassostrea virginica*, al inicio y final del bioensayo experimental. **M0**: Muestreo inicial, **T1**: RL8, **T2**: ViP 6C +ViA 6C, **T3**: PhA 6C+SiT 6C, **T4**: ViP 6C+ViA 6C+RL8, **T5**: PhA 6C+SiT 6C+RL8, **T6**: (Control positivo) alcohol de uso homeopático, **T7**: (Control negativo) agua destilada.69
- Figura 25.-** Área de cobertura (%) de la glándula digestiva en hembras de *Crassostrea virginica*, al inicio y final del bioensayo experimental. **M0**: Muestreo inicial, **T1**: RL8, **T2**: ViP 6C +ViA 6C, **T3**: PhA 6C+SiT 6C, **T4**: ViP 6C+ViA 6C+RL8, **T5**: PhA 6C+SiT 6C+RL8, **T6**: (Control positivo) alcohol de uso homeopático, **T7**: (Control negativo) agua destilada.70
- Figura 26.-** Altura de los túbulos digestivos (μm) de organismos de *Crassostrea virginica*, al inicio y final del bioensayo experimental. **M0**: Muestreo inicial, **T1**: RL8, **T2**: ViP 6C +ViA 6C, **T3**: PhA 6C+SiT 6C, **T4**: ViP 6C+ViA 6C+RL8, **T5**: PhA 6C+SiT 6C+RL8, **T6**: (Control positivo) alcohol de uso homeopático, **T7**: (Control negativo) agua destilada.71
- Figura 27.-** Número de hemocitos en glándula digestiva de organismos de *Crassostrea virginica*, obtenidos en cortes histológicos en un área de tejido de 0.21 mm^2 , al inicio y final del bioensayo experimental. **M0**: Muestreo inicial, **T1**: RL8, **T2**: ViP 6C +ViA 6C, **T3**: PhA 6C+SiT 6C, **T4**: ViP 6C+ViA 6C+RL8, **T5**: PhA 6C+SiT 6C+RL8, **T6**: (Control positivo) alcohol de uso homeopático, **T7**: (Control negativo) agua destilada.72
- Figura 28.-** Micrografías de glándula digestiva, gónada y hemocitos en glándula digestiva de *Crassostrea virginica*. Tinción de Hematoxilina-Eosina (100X barra de escala=200 μm ; 200X barra de escala= 100 μm y 1000X barra de escala= 10 μm). **M0**: Muestreo inicial, **T1**: RL8, **T2**: ViP 6C +ViA 6C, **T3**: PhA 6C+SiT 6C, **T4**: ViP 6C+ViA 6C+RL8, **T5**: PhA 6C+SiT 6C+RL8, **T6**: (Control positivo) alcohol de uso homeopático, **T7**: (Control negativo) agua destilada.73
- Figura 29.-** Electroforesis de ARN de gónada (muestras de la 1 a la 5), manto (muestras de la 6 a la 10), branquia (muestras de la 11 a la 15) y glándula digestiva (muestras de la 16 a la 20) de cinco individuos de *Crassostrea virginica*. La muestra 8 (*) muestra un ARN no-íntegro.74
- Figura 30.-** Electroforesis de la amplificación del ADNc sintetizado a partir de ARN total de los tejidos gónada (muestras de la 1 a la 5), manto (muestras de la 6 a la 10), branquia (muestras de la 11 a la 15) y glándula digestiva (muestras de la 16 a la 19) de *Crassostrea virginica*, realizada con el gen β -Actina con un tamaño de amplicón de 145 pb. Carril 1 (Marcador de peso molecular). Carril 20 (Muestra de ADNc de *Crassostrea gigas* (positivo)).74
- Figura 31.-** Estabilidad de los genes de referencia estimada con RefFinder. Los genes más estables fueron utilizados para la normalización de la expresión relativa de los genes blanco-analizados. FE= Factor de Elongación, 28S= 28S ribosomal y Beta-actina= β -Actina.75
- Figura 32.-** Expresión relativa del gen Lectina tipo C (LEC) en gónada, manto, branquia y glándula digestiva del ostión *Crassostrea virginica*. Los asteriscos indican diferencias significativas. El análisis estadístico entre Tratamientos mostró diferencias estadísticas ($p < 0.05$) y de igual manera entre Tejidos vs Tratamientos ($p < 0.05$). Las barras verticales representan las medias \pm el error estándar. **T1**: RL8, **T2**: ViP 6C +ViA 6C, **T3**: PhA 6C+SiT 6C, **T4**: ViP 6C+ViA 6C+RL8, **T5**: PhA 6C+SiT 6C+RL8, **T6**: (Control positivo) etanol de uso homeopático, **T7**: (Control negativo) agua destilada.76
- Figura 33.-** Expresión relativa del gen Glutación S-transferasa (GSTO), en gónada, manto, branquia y glándula digestiva del ostión *Crassostrea virginica*. Las barras verticales representan

las medias \pm el error estándar. **T1:** RL8, **T2:** ViP 6C +ViA 6C, **T3:** PhA 6C+SiT 6C, **T4:** ViP 6C+ViA 6C+RL8, **T5:** PhA 6C+SiT 6C+RL8, **T6:** (Control positivo) etanol de uso homeopático, **T7:** (Control negativo) agua destilada.77

Figura 34.- Expresión relativa del gen vitelogenina (VTG) en gónada, manto, branquia y glándula digestiva del ostión *Crassostrea virginica*. Los asteriscos indican diferencias significativas. El análisis estadístico entre tratamientos mostró diferencias estadísticas ($p < 0.05$) y entre Tejidos vs Tratamientos ($p < 0.05$). Las barras verticales representan las medias \pm el error estándar. **T1:** RL8, **T2:** ViP 6C +ViA 6C, **T3:** PhA 6C+SiT 6C, **T4:** ViP 6C+ViA 6C+RL8, **T5:** PhA 6C+SiT 6C+RL8, **T6:** (Control positivo) etanol de uso homeopático, **T7:** (Control negativo) agua destilada.78

Figura 35.- Expresión relativa del gen AF2 (Activation Functions 2) en gónada, manto, branquia y glándula digestiva del ostión *Crassostrea virginica*. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Las barras verticales representan las medias \pm el error estándar. **T1:** RL8, **T2:** ViP 6C +ViA 6C, **T3:** PhA 6C+SiT 6C, **T4:** ViP 6C+ViA 6C+RL8, **T5:** PhA 6C+SiT 6C+RL8, **T6:** (Control positivo) etanol de uso homeopático, **T7:** (Control negativo) agua destilada.79

Listado de tablas

Tabla 1.- Descripción de los diferentes estadios de desarrollo gonádico en <i>Crassostrea gigas</i> , <i>Crassostrea corteziensis</i> y <i>Crassostrea virginica</i>	21
Tabla 2.- Concentración del principio activo TM en las diferentes diluciones homeopáticas usadas en acuicultura, centesimal (C) o decimal (D).	29
Tabla 3.- Efectos de la aplicación de CBAD en diferentes grupos de organismos marinos de importancia acuícola o pesquera.	38
Tabla 4.- Diseño experimental para evaluar el efecto individual y sinérgico de CBAD y ACTIN en reproductores de ostión americano <i>Crassostrea virginica</i> (Gmelin, 1791) acondicionados para su maduración sexual en condiciones controladas de laboratorio. N: número de organismos; NT: número total de organismos por tratamiento.	47
Tabla 5.- Secuencias de los <i>primers</i> utilizados en el análisis de expresión diferencial de genes asociados con el proceso reproductivo y respuesta inmune de <i>Crassostrea virginica</i> , y de genes de referencia.	55
Tabla 6.- Microfotografías de los estadios de desarrollo gonádico identificados en hembras de <i>Crassostrea virginica</i> tratadas con Compuestos Bioactivos Altamente Diluidos (CBAD) y Actinomicetos (ACTIN). Imágenes histológicas 20X (200X barra de escala=100 μ m).	58

Abreviaturas

ACTIN: Actinomicetos

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADN_C: Ácido desoxirribonucleico complementario

AF2: Activation functions 2

ARN_m: Ácido ribonucleico mensajero

CBAD: Compuestos Bioactivos Altamente Diluidos

DT: Diámetro teórico del ovocito

FLPs: Fosfolípidos

GSTO: Glutathion S-transferasa

IGD: Índice de la glándula digestiva

LEC: Lectina

NP: Nanopartículas

PhA: Medicamento homeopático *Phosphoricum acid* (Similia® MX)

SB: Sistema Biológico

SiT: Medicamento homeopático *Silicea terra* (Similia® MX)

TGS: Triglicéridos

ViA: Producto homeopático desarrollado en el CIBNOR, a partir de un lisado inactivado de *Vibrio alginolyticus*

ViP: Producto homeopático desarrollado en el CIBNOR, a partir de un lisado inactivado de *Vibrio parahaemolyticus*

µm: Micras

VTG: Vitelogenina

1. INTRODUCCIÓN

La ostra americana, *Crassostrea virginica* es un molusco bivalvo marino, económicamente importante para las costas atlánticas de EUA y de México (FAO, 2023), cuyas poblaciones silvestres han disminuido por sobreexplotación pesquera, degradación del hábitat, reducción de la calidad del agua y mortandad masiva asociada a propagación y aparición de patógenos bacterianos y protozoarios (Ford, 2001; Mackenzie, 2007; Elston *et al.*, 2008).

Recientes esfuerzos enfocados hacia el perfeccionamiento de las metodologías de cultivo y la optimización del crecimiento han permitido a la ostricultura de *C. virginica* posicionarse como una industria acuícola potencial en los mercados nacionales e internacionales (Thomas *et al.*, 2019). Sin embargo, el incremento de la producción acuícola a partir de la producción controlada de semillas sigue siendo limitado, debido a que involucra una serie de retos como el rendimiento reproductivo de los adultos usados como reproductores en los laboratorios productores de semillas (Smolowitz, 2013). Lo anterior se ha relacionado principalmente con aspectos de sanidad y nutrición de la especie (Mazón-Suástegui *et al.*, 2015b; Yu *et al.*, 2021).

Tener reproductores con un mejor rendimiento gonádico, nutricional y respuesta inmune es un objetivo esencial para la ostricultura (Migaud *et al.*, 2013; Tresnati *et al.*, 2020; Szmyt *et al.*, 2021). Analizar las características del stock reproductivo de los moluscos, incluido *C. virginica* es de gran importancia para la industria ostrícola, ya que es un factor determinante que define la calidad y el valor económico de las semillas producidas (Mansfield, 2010; CONAPESCA, 2012; Natale *et al.*, 2013; Yoshizaki y Yazawa, 2019; Policar *et al.*, 2019). Adicionalmente y de vital importancia, es el analizar aspectos relacionados con la incidencia de patógenos y parásitos como *Perkinsus marinus*, causantes de mortalidades y afectaciones fisiológicas que pueden mermar calidad reproductiva en los reproductores (Smolowitz, 2013). Para hacer frente a estos desafíos, recientemente se ha propuesto la aplicación de compuestos bioactivos altamente diluidos (CBAD) y/o de actinomicetos marinos del género *Streptomyces sp* (ACTIN) para estimular la condición fisiológica general, la respuesta inmune, la calidad nutricional y el desarrollo gonádico del stock reproductivo (Mazón-Suástegui *et al.*, 2018).

Los Compuestos Bioactivos Altamente diluidos (CBAD), son ultra diluciones de origen animal, vegetal o mineral elaboradas de conformidad con la Farmacopea Homeopática de los Estados Unidos Mexicanos (Secretaría de Salud, 2015), que se han propuesto y adoptado como nuevos tratamientos sustentables, eco-amigables e inocuos (López-Carvallo *et al.*, 2022). Recientes investigaciones han demostrado que su aplicación en la almeja Catarina *Argopecten ventricosus* ha mejorado la actividad enzimática y la acumulación, transporte y asimilación de reservas energéticas, permitiendo incrementar la supervivencia, la condición nutricional y la calidad ovocitaria. Estos resultados derivan de la aplicación profiláctica de los siguientes CBAD: PhA (*Phosphoricum acid* = ácido fosfórico), utilizado en humanos para mejorar la condición general del paciente; SiT (*Silicea terra*), una sal mineral usada para mejorar la condición general y vitalidad; PaV (Pasival), una mezcla de *Passiflora incarnata*, *Valeriana officinalis*, *Ignatia amara* y *Zincum valerianicum*, usada para relajación e inducción del sueño (López-Carvallo *et al.*, 2019; Mazón-Suástegui *et al.*, 2019).

De acuerdo con García-Corona (2018), en el mejillón café *Modiolus capax* se ha mejorado la condición gonádica y la respuesta inmune con la aplicación de PhA, SiT y ViP (desarrollado en el CIBNOR, a partir de un lisado inactivado de *Vibrio parahaemolyticus*) y ViA (desarrollado en el CIBNOR, a partir de un lisado inactivado de *Vibrio alginolyticus*). En peces como *Seriola rivoliana* la aplicación de PhA, SiT, ViP y ViA ha mejorado la actividad enzimática digestiva de juveniles (Mazón-Suástegui *et al.*, 2019). En general, las investigaciones señalan que la aplicación profiláctica (preventiva) de CBAD, ha mejorado la condición fisiológica general de los organismos, activando mecanismos de defensa y biológicos a nivel molecular, dirigidos al mantenimiento y/o la recuperación de un equilibrio fisiológico (homeostasis) en los organismos marinos así tratados (López-Carvallo *et al.*, 2020).

Adicionalmente, se ha demostrado que los actinomicetos marinos probióticos (ACTIN) como la cepa RL8 de *Streptomyces sp*, pueden promover la maduración gonadal, mejorar la condición fisiológica, y la absorción de macro y micronutrientes en el camarón blanco *Penaeus vannamei* (García-Bernal *et al.*, 2017), ostión Kumamoto *Crassostrea sikamea* (García-Bernal *et al.*, 2019) y ostión de Placer *C. corteziensis* (García-Bernal *et al.*, 2019). Con base a los resultados obtenidos,

se ha concluido que los ACTIN tienen potencial para ser aplicados en la acuicultura de varias especies de interés económico con el fin de incrementar el rendimiento productivo del cultivo (Dharmaraj y Kandasamy, 2010; Das *et al.*, 2010; Dharmaraj, 2011).

Por lo antes expuesto, en la presente investigación se analizó el efecto individual y sinérgico de los CBAD (ViA-6C, ViP-6C, PhA-6C y SiT-6C) y la cepa RL8 del actinomiceto probiótico *Streptomyces sp* (ACTIN), en reproductores de ostión Americano *C. virginica* cultivados en el laboratorio ostrícola comercial del Centro Ostrícola Tecnológico de Tabasco (COTET), que produce semillas de esta especie en el Golfo de México. El efecto de los tratamientos experimentales se evaluó mediante la expresión de genes asociados con la respuesta inmune y el proceso reproductivo, utilizando tecnología de PCR cuantitativa conocida como qPCR, ampliamente utilizada en diferentes especies de moluscos bivalvos como *A. ventricosus* (López-Carvallo *et al.*, 2020), *Crassostrea ariakensis* (Liu *et al.*, 2019) y *C. gigas* (Lim *et al.*, 2016; Yue *et al.*, 2018). Para evaluar el efecto a nivel de condición reproductiva, se caracterizaron los estadios de madurez gonádica, frecuencia de estadios y de ovocitos, y se obtuvieron mediante técnicas histológicas e histoquímicas, índices de calidad reproductiva y ovocitaria como el diámetro teórico (DT) y la relación núcleo/citoplasma (N/C).

2. ANTECEDENTES

2.1 Características biológicas de *Crassostrea virginica*

La ostra americana *C. virginica*, conocida en México como “Ostión del Golfo”, es una especie de molusco bivalvo marino, económica y ecológicamente importante. Se distribuye en el litoral del Atlántico desde el Golfo de St. Lawrence en Canadá hasta Argentina, siendo Canadá, Estados Unidos y México los principales países productores de esta especie (Fig. 1). *C. virginica* ha sido introducido en la Columbia Británica, Canadá; en la costa oeste de los Estados Unidos de América; en Hawaii; Australia, Japón y Reino Unido, pero no se han establecido poblaciones comerciales auto sustentables (FAO, 2023).

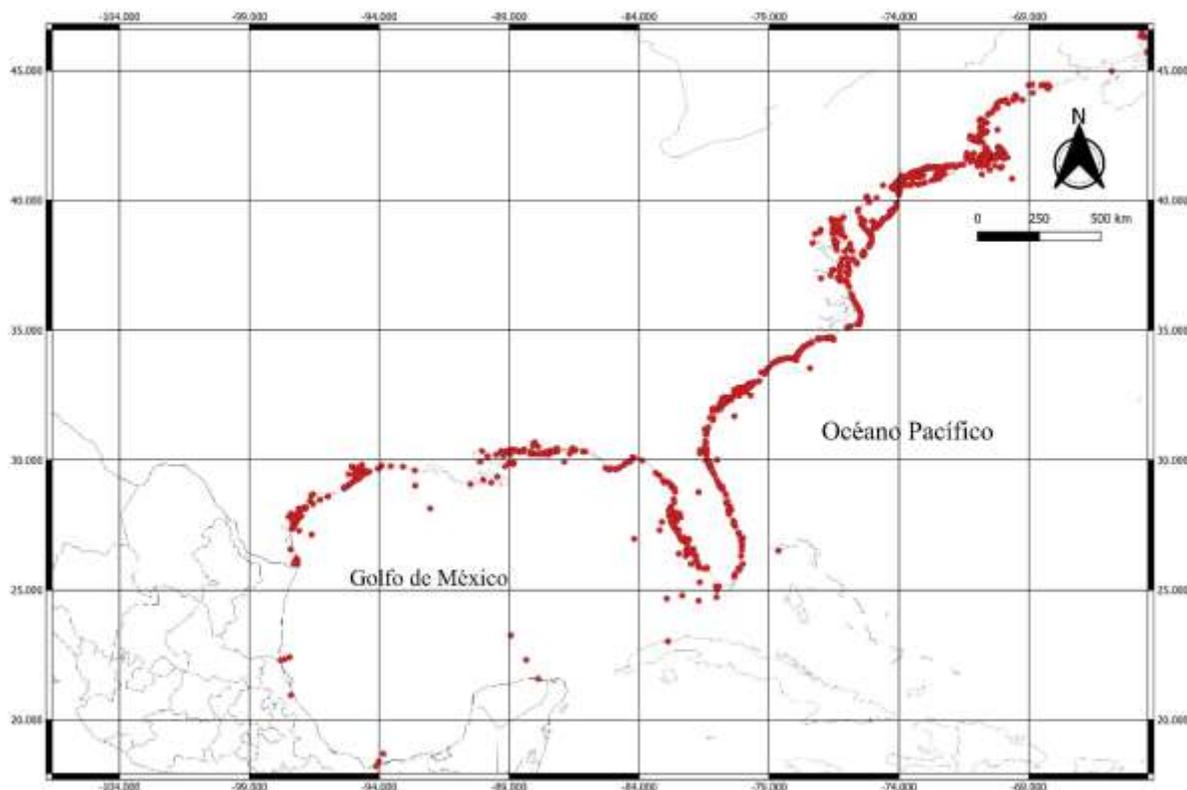


Figura 1.- Distribución geográfica de *Crassostrea virginica* en los principales países productores. Mapa realizado con datos georreferenciados de localización reportados para la especie. Fuente: GBIF Backbone Taxonomy. Fecha de consulta 24/08/2022.

C. virginica es un organismo filtrador que habita principalmente en estuarios, lagunas o esteros, y su ciclo de vida se rige en función de factores bióticos y abióticos estuarinos (Betanzos *et al.*,

2016). Los adultos reproductores descargan sus gametos en la columna de agua en respuesta a una variedad de estímulos, incluyendo temperaturas más cálidas, feromonas, y la presencia de fitoplancton apropiado para su alimentación. Los huevos fertilizados se transforman en larvas trocófora, las cuales se encuentran sustentadas por las reservas energéticas internas presentes en el huevo. Estas reservas están estrechamente relacionadas con la calidad ovocitaria de las hembras, ya que constituyen una fuente vital de energía para el desarrollo de las larvas. Después de aproximadamente 24 horas, las trocóforas se desarrollan en larvas véliger que ya tienen una concha y un órgano ciliado (vélum) para capturar alimento y nadar. Después de dos o tres semanas, dependiendo de las condiciones de alimento y temperatura, la larva véliger se desarrolla en una larva umbonada y finalmente una larva pedivéliger identificada principalmente por la aparición de una mancha ocular y un pie con el cual exploran potenciales substratos para el asentamiento. Una vez estimuladas a asentarse, cementan su valva izquierda al substrato y se transforman por metamorfosis en un juvenil de ostra descartando su vélum, reabsorbiendo su pie y desarrollando su aparato branquial. El juvenil se desarrolla hasta alcanzar la etapa adulta.

Los ostiones adultos alcanzan tallas de hasta 150 mm de longitud. Presentan una forma corporal de simetría bilateral, comprimida lateralmente y una concha de dos valvas (bivalva) desiguales, de forma irregular, que puede ser orbicular hasta francamente alargada y moderadamente gruesa con una superficie rugosa con escamas, márgenes de las valvas rectos y ondulados (Fig. 2). El umbo es largo y curvado; la valva derecha es más pequeña y aplanada que la izquierda. La concha se encuentra cementada al sustrato por un biso calcificado. La valva izquierda (inferior) tiene forma convexa, y valva derecha (superior) tiende a ser aplanada, aunque a menudo doblada asentándose dentro de la izquierda; la estructura de la concha tiende a tener lados desiguales con tendencia a ser ampliamente oval en el contorno, pero a menudo distorsionada (García y Reguero, 2007). La línea de la charnela carece de dientes en el adulto y los márgenes de la concha son lisos. La concha es de color blanco sucio o café; algunas veces con marcas púrpura oscuras y el interior de la concha es blanco con una impresión del músculo aductor cerca del margen posterior, de color púrpura oscuro o café rojizo (Kennedy y Sanford, 1999).

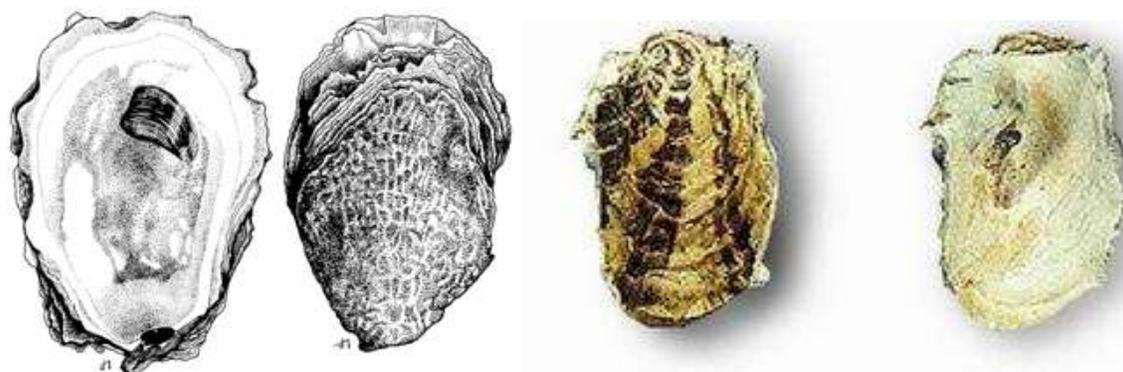


Figura 2.- Características morfológicas externas de las conchas del ostión Americano *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791). Fuente: FAO Fisheries & Aquaculture – Programa de información de especies acuáticas. Fecha de consulta: 18/08/2022. https://www.fao.org/fishery/docs/DOCUMENT/aquaculture/CulturedSpecies/file/es/es_crassostreavirginica.htm

2.2 Pesquería de *Crassostrea virginica* en México

Por su volumen de producción en México, *C. virginica* representa un alto valor económico con más de 441 millones de pesos anuales, siendo Estados Unidos el principal destino de exportación (CONAPESCA, 2019). De acuerdo con el informe del proyecto “Moluscos Bivalvos” del COSAP (Comité de sanidad acuícola y pesquero veracruzano A.C “REG NO. 24/SENASICA/DGSA/VER/05-2015, se estima que en el estado de Veracruz se obtuvieron aproximadamente 19 mil toneladas de ostión vivo en su concha anualmente durante el lapso comprendido entre 1999 y 2015. De acuerdo con los registros, la especie soporta una pesquería importante para Veracruz, Tabasco y Tamaulipas representado casi el 90 % de los volúmenes producción total en México (Fig. 3).

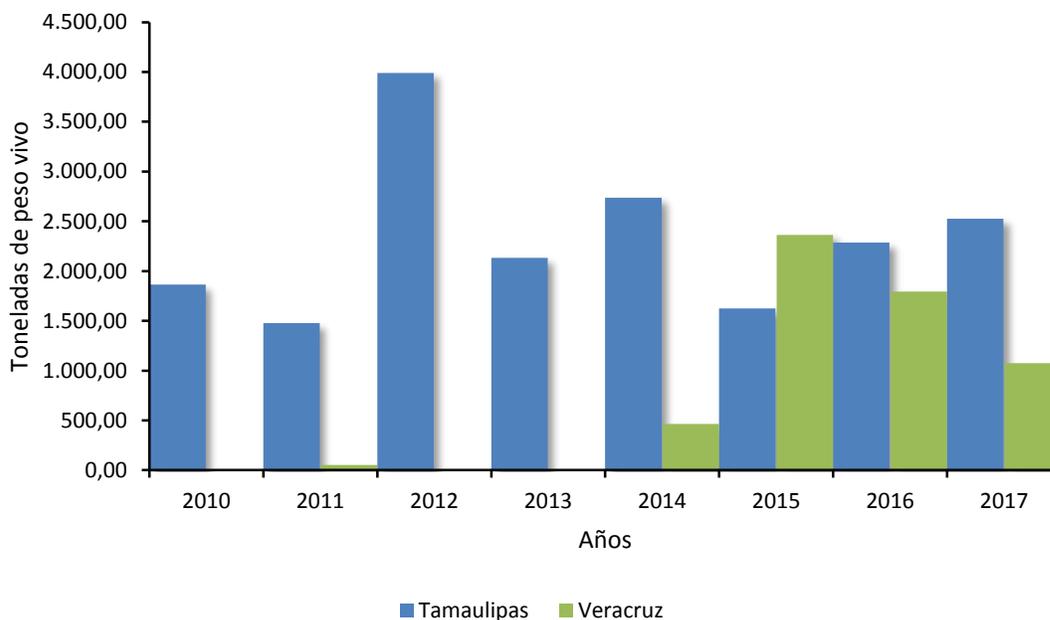


Figura 3.- Datos de extracción de ostión americano *Crassostrea virginica*. Fuente: Plataforma ACUASESOR: <https://acuasesor.conapesca.gob.mx/anuario.php>. Fecha de consulta: 07/09/2022.

La pesquería de *C. virginica* se ve típicamente afectada por la sobreexplotación del recurso, por la degradación del hábitat, por la reducción de la calidad hídrica costera y por eventos de mortalidad causados por aparición y propagación de enfermedades infecciosas (Pales-Espinoza *et al.*, 2014a). La presencia de patógenos con alta virulencia como *P. marinus*, ha afectado a las poblaciones nativas en las costas de EU y de México (COSAP, 2015). Otros factores de riesgo para las poblaciones naturales y las cultivadas, son los asentamientos humanos, las descargas de aguas residuales en los sistemas lagunares, las obras de construcción de ductos de petróleo y gas, y la variabilidad climática, que se suman a otro factor regulatorio importante, como la falta de rigor y de seguimiento para el cumplimiento de las diferentes normatividades aplicables en materia de pesca y ostricultura (COSAP, 2015).

Algunos autores consideran subexplotado el recurso en zonas específicas (Arias, 2014), pero en la carta nacional pesquera (CONAPESCA, 2012) se reporta que las poblaciones naturales se encuentran a un nivel de explotación máxima sostenible y debido a su amplia distribución, algunos autores consideran que para su manejo es conveniente aplicar criterios regionales. De igual manera se ha sugerido avanzar en la tecnificación del cultivo y en la producción de semillas

de *C. virginica*, lo que posibilitaría obtener un suministro constante del recurso reduciendo así la necesidad de depender en gran medida de organismos provenientes del medio natural.

2.3 Acuicultura de *Crassostrea virginica*

Los esfuerzos de cultivo del ostión americano iniciaron en la costa este de Norte América para rehabilitar bancos sobreexplotados y mejorar las cosechas (Thomas *et al.*, 2019). Actualmente, el método de cultivo más sencillo consiste en liberar conchas de ostras con fijaciones o semillas (naturales o de laboratorio), directamente sobre el fondo marino arenoso y firme, donde puedan crecer y reproducirse. La concha con fijación natural es un subproducto del proceso manual o mecánico de desconche y se obtiene en plantas procesadoras de ostras. La semilla fijada en “concha madre” (*On-Cultch*) es resultado de un proceso controlado de laboratorio donde se realiza la fijación larvaria en conchas limpias e intemperizadas. Ésta es una alternativa tecnológicamente más confiable, segura y rentable. Otra opción es el acondicionamiento de fondos areno-fangosos suaves donde no existen bancos naturales, y consiste en liberar conchas “fósiles” producto del dragado de sedimentos estuarinos. Si el hábitat natural o acondicionado es apropiado, los juveniles crecerán a talla comercial y se cosecharán manualmente o mediante dragado mecánico. Estas técnicas han sido usadas por agencias de gobierno y por productores para rehabilitar bancos sobreexplotados o para crear nuevos bancos e incrementar la producción (INAPESCA, 2016; Steppe *et al.*, 2016; Thomas *et al.*, 2019).

La acuicultura de *C. virginica* en México se inició en los años 40’s en el estado de Tabasco, y fue hasta los años 70’s cuando la actividad ostrícola se ordenó y se formalizó con asistencia técnica gubernamental hacia los productores (INAPESCA, 2016). A partir del año 2000 se creó el “Comité Sistema Producto Ostión” en respuesta a la necesidad de cultivar ostión de manera complementaria a la extracción, en épocas de veda y para aumentar la producción para el mercado nacional e internacional. Según INAPESCA, (2021), la mayor parte del cultivo de *C. virginica* en México se considera como una “pesquería acuacultural”, actividad en la cual los ostricultores colocan colectores de concha como sustrato para la fijación larvaria y captación de semilla silvestre derivada del desove de reproductores que habitan en el medio natural.

Actualmente existen en el Golfo de México, 43 granjas ostrícolas, 8 en Veracruz, 1 en Tamaulipas y 35 en Tabasco. Durante la última década se han desarrollado en esta región, diversos proyectos de cultivo a partir de semillas fijadas en “concha madre” (*On-Cultch*), y esto ha sido posible gracias a la producción masiva de larva “fijadora” (pedivéliger con mancha ocular) en el Centro Ostrícola Tecnológico de Tabasco (COTET). Recientemente, la actividad ostrícola de Tabasco y de otros estados del Golfo de México se ha tecnificado mediante la siembra de semilla suelta, individual o libre de sustrato (*Cultch-Less*), una nueva línea de producción del COTET. La semilla suelta se cultiva con ajustes periódicos de densidad, en cajas y costales ostrícolas, canastas australianas importadas o de fabricación nacional; los productores han tenido apoyo financiero gubernamental y se mantiene un constante seguimiento y monitoreo al cultivo (INAPESCA, 2021).

El COTET fue financiado parcialmente por CONACYT-PROINNOVA con la asesoría tecnológica del CIBNOR y apoyos de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT). El resultado de siete años de vinculación Academia-Empresa, fue la construcción, diseño de prototipos y zootecnias, puesta en marcha y operación del primer laboratorio ostrícola a nivel comercial, único en su clase, dedicado a producir semillas de *C. virginica* en México, y certificado por INAPESCA (Pérez, 2022).

En Tabasco, el cultivo (engorde comercial) de *C. virginica* se realiza en los dos grandes complejos lagunares del estado: Carmen-Pajonal-Machona-Redonda y la Laguna Mecoacán (Betanzos *et al.*, 2016), mientras que en Veracruz se realiza en 12 sistemas lagunares menores, como Laguna de Pueblo Viejo, Laguna de Tamiahua, Laguna de Tampamachoco, Laguna Grande y Chica, Estuario Casitas Nautla, Laguna La Mancha, Sistema Lagunar Alvarado, Laguna Camaronera, Laguna Mandinga, Laguna Sontecomapan y Laguna del Ostión (COSAP, 2015).

2.3.1 Producción de semillas de *Crassostrea virginica*

La producción de semillas en laboratorio comprende varias etapas secuenciales y se inicia con el acondicionamiento gonádico de reproductores en ambiente controlado. Los ostiones adultos con algún grado de madurez sexual pueden ser manipulados para retrasar, mantener o

promover su desarrollo gonádico (Mazón-Suástegui *et al.*, 2011a; Mazón-Suástegui, 2011) y para ello son mantenidos a una temperatura acorde con el objetivo del acondicionamiento y mientras tanto son alimentados con microalgas naturales en condiciones de flujo abierto y continuo o con microalgas cultivadas y flujo limitado recirculante hasta lograr inducir su maduración total. Las principales microalgas cultivadas son las diatomeas *Chaetoceros calcitrans* y *Thalassiosira pseudonana* (celon 3H Hasle *et Heimdal*) y el flagelado *Isochrysis galbana* cepa Tahitiana (T-Iso) (López *et al.*, 2009; Gutiérrez *et al.*, 2017; Carrera, 2018). El acondicionamiento gonádico permite garantizar éxito en la inducción al desove fuera de estación, usualmente meses antes de lo que estarían en la naturaleza (Mazón-Suastegui *et al.*, 2009). Alternativamente, los adultos maduros pueden ser colectados o cosechados y transferidos a unidades termo-reguladas de acondicionamiento gonádico para ser desovados en una fecha programada, mediante estimulación física, química o biológica (Mazón-Suástegui *et al.*, 2011d).

Durante el proceso de inducción al desove, los adultos maduros son generalmente transferidos de las unidades de acondicionamiento a unidades de desove individual o grupal, donde son sometidos a shock térmico con agua caliente (hasta 30°C) para la obtención por separado de los gametos masculinos y femeninos, cuya fertilización permitirá el desarrollo de embriones y larvas (Mazón-Suástegui *et al.*, 2008; Mazón-Suástegui *et al.*, 2011d). Si el desove se induce de manera grupal, los ostiones desovantes son transferidos individualmente a recipientes menores con agua de mar filtrada y esterilizada, a la temperatura del desove donde continúa la liberación de gametos de ambos sexos, por separado. Los productos sexuales son lavados por separado a través de un tamiz con malla fina para eliminar restos de tejido que son expelidos durante el desove. Una pequeña cantidad de esperma de varios machos es mezclada con los huevos y la fertilización es supervisada microscópicamente para asegurar que ha sido exitosa, es decir, superior al 90% (Mazón-Suástegui *et al.*, 2011b).

Los huevos fertilizados son colocados en tanques de cultivos de diversos volúmenes, con agua filtrada, esterilizada y aireación moderada, donde tiene lugar el desarrollo embrionario y larvario hasta obtener el primer estadio de larva véliger “D” o de charnela recta. Las larvas “D” se cosechan al día siguiente, drenando los tanques de cultivo larvario a través de tamices de

malla con la apertura necesaria para su retención, se cuantifica y transfiere a un nuevo tanque de cultivo larvario con agua de mar filtrada y esterilizada, a una densidad preferentemente no mayor a 10 lavas/ml; se proporciona alimento (microalgas) a una concentración no mayor de 30,000 cel/ml y se provee aireación profusa. En los sucesivos, los tanques son drenados cada tercer día, utilizando tamices con malla de apertura mayor, se cuantifican y se transfieren a nuevos tanques de cultivo, ajustando progresivamente la densidad hasta tener una larva pedivéliger por mililitro, mientras la concentración de microalgas se eleva hasta 60,000 cel/ml (Mazón- Suástegui *et al.*, 2009; Mazón-Suástegui *et al.*, 2011b; Mazón-Suástegui *et al.*, 2018).

Mediante este procedimiento, que puede tener una duración media de tres semanas, y asumiendo que las larvas más grandes y de mayor crecimiento serán las más saludables, podrán eliminarse las larvas de menor talla. Sin embargo, la mayor parte de las larvas pueden alcanzar el estadio pedivéliger a una talla diferente y ser fijadas a un sustrato, concluir su vida pelágica y convertirse en semillas. Por ello, es posible obtener dos o tres lotes de larva fijadora en un periodo de dos a tres días después de haber detectado la presencia de un 60% de larva pedivéliger (“larva fijadora”) y realizar una selección de organismos por talla, utilizando tamices de malla decreciente (Mazón-Suástegui *et al.*, 2009; Mazón-Suástegui *et al.*, 2011b; Mazón-Suástegui *et al.*, 2011c; Mazón-Suástegui, 2011d; Mazón-Suástegui, 2018) (Fig. 4)

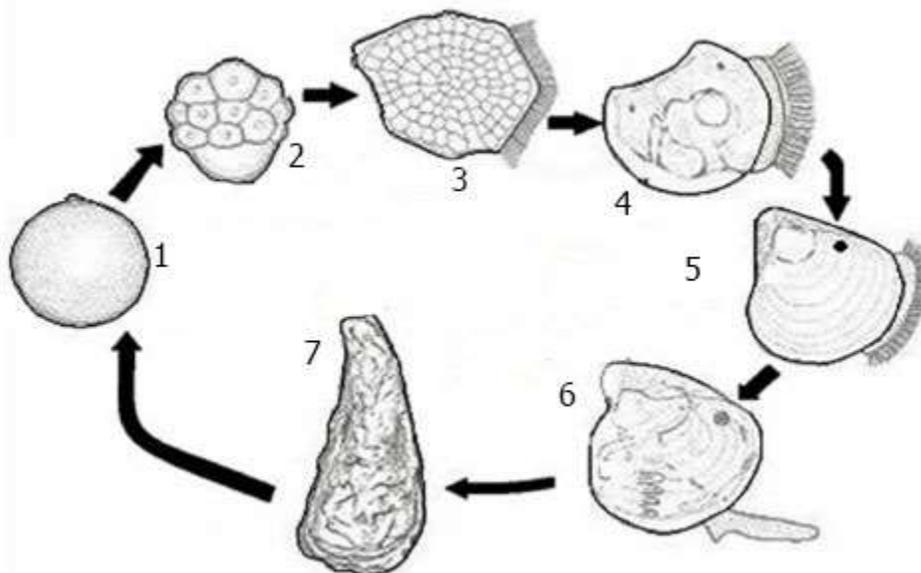


Figura 4.- Ciclo natural de vida del ostión. Ovulo fecundado (1), división del ovulo (2), larva trocófora (3), larva véliger de charnela recta (4), larva véliger umbada madura (5), larva pedivéliger oculada competente para fijación (6), ostión completamente desarrollado (7). Fuente: Tomado y modificado de Ikenowe y Kafuku (1992).

Previo a su fijación, las larvas pedivéliger cosechadas se cuantifican, se mantienen en refrigeración por 24 horas y se transfieren a las unidades necesarias para el tipo de semilla que se desea producir. Para producir semillas de ostión en concha madre, las larvas se colocan en tanques con agua de mar filtrada y aeración turbulenta, conchas limpias del mismo ostión como sustrato, y una densidad variable (80 a 100 larvas/concha), con expectativa de obtener hasta 10-20 semillas/concha. Para producir semillas suelta o individual, las larvas se colocan en unidades tipo tamiz de forma circular o rectangular, con malla de 180 μm , flujo descendente de agua filtrada y alimento, a una densidad no mayor a 9 mm^2 , y como sustrato de fijación se coloca una capa fina de concha de ostreidos o pectínidos finamente molida hasta obtener partículas con un tamaño medio de 200 a 300 μm (0.025mm), con la expectativa de obtener un 20 a 40% de semillas (Mazón-Suástegui *et al.*, 2009; Mazón-Suástegui *et al.*, 2011c).

La fijación *in-situ* de semilla en “concha madre” de *C. virginica* es una de las opciones que ofrece el COTET y su proceso puede realizarse en sus propios tanques de fijación y utilizando conchas de ostión como sustrato colector. Alternativamente, y conforme al diseño CIBNOR, el COTET

puede realizar una fijación “remota” en unidades modulares móviles que incluyen tanques de fibra de vidrio, estructuras metálicas, malla-sombra, colectores (sartas, collares o costales de conchas), equipo eléctrico para bombeo, aireación y larva fijadora. Esta técnica es también utilizada en la zona de San Quintín B.C., para el ostión Japonés *C. gigas* (Mazón-Suástegui, 1996). Los productores adquieren larva fijadora en laboratorios ostrícolas del Pacífico mexicano y disponen de tanques de concreto para su fijación remota. Los laboratorios envían larva fijadora empacada en forma de esfera de papel húmedo, dentro de hieleras o cajas térmicas con hielo en gel, a fin de mantener una temperatura de 7-10 °C. En campo, la semilla fijada en concha madre se cultiva en suspensión; crece en agregaciones y compiten entre sí por espacio y alimento; tiene forma y tamaño irregular, y aunque puede separarse en piezas individuales, una gran parte del producto debe desconcharse para su comercialización (Mazón-Suástegui *et al.*, 2009b).

Adicionalmente, en el COTET se produce semilla suelta de *C. virginica* individual o libre de sustrato, aplicando metodologías antes descritas, en las que se utilizan tamices de fijación y concha molida como sustrato, que por su pequeño tamaño ya no es detectable en semillas o juveniles. El uso de tratamientos químicos también se ha utilizado con éxito para inducir comportamiento reptante y la metamorfosis de larvas pediveliger sin ningún tipo de sustrato. A diferencia de la semilla fijada en “concha madre”, el cultivo de la semilla suelta es mucho más tecnificado; se necesitan artes de cultivo (cajas ostrícolas, canastas australianas, linternas, costales de fondo, etc.) y mayor cantidad de mano de obra. Sin embargo, este manejo zootécnico permite tener un mayor manejo de los organismos para su limpieza, manejo de densidad y monitoreo en campo. Así mismo, la semilla suelta permite obtener piezas individuales con forma y tamaño mucho más atractivos para su venta en restaurantes y marisquerías, como ostión vivo en su concha, y a un precio mayor (Mazón-Suástegui *et al.*, 2009b; Trejo, 2017).

En general, las ostras se comercializan en diferentes presentaciones vivas, a media concha, congeladas o desconchadas, con un valor promedio de 0.10 USD por pieza. En México, el precio de ostión desconchado ronda los 10 pesos MXN (0.5 USD), mientras que en su concha se comercializa a 23 pesos MXN (1.35 USD) (Delmare Gourmet, 2023). La carne se embala en

contenedores y se vende fresca o congelada. Los productos con valor agregado incluyen sopas, guisos, paellas, empanadas, así como salsas de ostras. En general, el cultivo de ostras como *C. virginica* tiene un amplio mercado y potencial económico (Grabowski *et al.*, 2003; Avilés y Vázquez, 2006; Trejo, 2017)

2.4 Problemáticas en el cultivo de *Crassostrea virginica*

Hasta hace poco, las industrias ostrícolas de la costa este y del Golfo en Norte América no habían tenido programas de crianza de largo tiempo, entorpeciendo con ello la domesticación de las ostras reproductoras. Actualmente, está en curso un programa de mejoramiento de reproductores en algunos estados de Estados Unidos (Thomas *et al.*, 2019), y varios proyectos en los estados del Atlántico medio están orientados a desarrollar ostras resistentes a las enfermedades (Callam *et al.*, 2016). El éxito de estos programas reside en la tecnificación para la producción de semilla en laboratorio donde se tiene un control entre la cruce de familias de ostras que permite obtener caracteres fenotípicos deseables en la descendencia. (Blanchard *et al.*, 2017).

Una opción para compensar la disminución del producto derivado de la extracción pesquera es desarrollar y optimizar la ostricultura y resolver las problemáticas y retos de la actividad. Esto demanda investigaciones y proyectos de innovación y desarrollo tecnológico con mejora continua. Obviamente, posicionar y fortalecer la industria acuícola de una especie requiere inversión gubernamental, social y privada y (CONAPESCA, 2012; Abdelrahman *et al.*, 2017).

Mejorar la capacidad reproductiva, respuesta inmune y calidad nutricional en los laboratorios productores de semillas de ostreidos son una prioridad fundamental para esta industria (García-Bernal *et al.*, 2020; Mazón-Suástegui *et al.*, 2021). Los laboratorios ostrícolas comerciales desempeñan un papel fundamental en la ostricultura ya que permiten la planificación precisa de la producción de semillas según la demanda, satisfaciendo así las necesidades esenciales para el cultivo comercial de ostreidos. Este enfoque posibilita una producción controlada, sostenible y en constante crecimiento, en contraste con la forma tradicional, insegura y aleatoria, de recolectar semillas directamente del medio natural (Mazón-Suástegui, 2018).

La salud, alimentación y cuidados de los reproductores influye en su capacidad reproductiva (Floreto *et al.*, 2001). Ariadi *et al.* (2019) mencionan que una adecuada nutrición durante el acondicionamiento gonádico permitirá la obtención de semillas de alta calidad, mayor supervivencia y crecimiento rápido. La resistencia a enfermedades es esencial para mantener una buena eficiencia en laboratorios ostrícolas. Morales-González *et al.* (2020) resalta la importancia de mejorar la respuesta inmune de reproductores y semillas.

Uno de los principales desafíos en el proceso de acondicionamiento gonádico es mejorar el rendimiento reproductivo (Lawale *et al.*, 2014; McFarland *et al.*, 2020; Matt y Allen, 2021; Clements *et al.*, 2021) y la condición nutricional de los reproductores. Es igualmente importante la prevención y/o control de infecciones como la del protozooario *P. marinus*, que afectan la condición fisiológica y capacidad gonádica de los organismos (Burrenson y Ford, 2002; Smolowitz, 2013). Por otro lado, las infecciones asociadas a *Vibrio sp.* causan mortalidad en etapas larvarias (Liao y Huang, 2000; Elston *et al.*, 2008; Lavaud *et al.*, 2017). Estudios recientes han aportado conocimiento que ha permitido mejorar aspectos de sanidad en la acuicultura de *C. virginica*. Karim *et al.* (2013) registraron un incremento en la protección de larvas y juveniles frente a bacterias patógenas con la cepa probiótica OY15 y Modak y Gómez, (2020), encontraron que los probióticos *Bacillus pumilus* RI06-95 y *Phaeobacter inhibens* S4 disminuyen significativamente la mortalidad causada por el patógeno bacteriano *V. coralliilyticus* RE22 en semillas.

Igualmente, se reportan avances mediante la selección artificial y mejoramiento para el desarrollo de líneas genéticas diploides y triploides con mejores capacidades fisiológicas y mayor rendimiento (Harding, 2007; Walton *et al.*, 2013; Callam *et al.*, 2016; Matt y Allen, 2021). Adicionalmente se han realizado investigaciones para mejorar la capacidad fisiológica general mediante la aplicación de Compuestos Bioactivo Altamente Diluidos (CBAD).

Se ha observado que la aplicación profiláctica de algunos CBAD y ACTIN en moluscos, crustáceos y peces, puede estimular la auto-recuperación de la homeostasis (sinónimo de salud), cuando ésta se ha perdido por factores externos o internos, y se ha demostrado su capacidad para estimular y modular el sistema inmune, reducir estrés, mejorar asimilación de nutrientes,

crecimiento, supervivencia, madurez gonádica, calidad ovocitaria y desempeño productivo de los organismos en cultivo (Mazón-Suástegui *et al.*, 2019; García-Bernal *et al.*, 2020). Lo anterior sugiere que el uso de CBAD y cepas probióticas de actinomicetos (ACTIN) tiene potencial aplicación en el acondicionamiento gonádico de *C. virginica* para promover su maduración sexual e incrementar calidad gonádica, respuesta inmune y condición nutricional de los reproductores, y para ello es indispensable entender su fisiología reproductiva y el funcionamiento de su sistema inmunitario (Mazón-Suástegui *et al.*, 2008; García-Bernal *et al.*, 2020).

2.5 Reproducción de *Crassostrea virginica*.

El ostión Americano *C. virginica* es un organismo protándrico y madura inicialmente como macho, pero, tiene cambios de sexo a hembra después de la primera madurez (INAPESCA, 2016; Betanzos *et al.*, 2018). En el Golfo de México, la especie presenta dos temporadas de máxima reproducción, una característica distintiva de las especies tropicales, y factores bióticos y abióticos como disponibilidad de alimento, temperatura, salinidad, presencia de patógenos y latitud, influyen en el reloj biológico que regula el desarrollo gonádico de los ostreidos (Rodríguez-Jaramillo, 2014).

2.5.1 Almacenamiento de nutrientes en moluscos bivalvos

La disponibilidad del alimento es determinante durante en el proceso de gametogénesis y es un factor importante en la calidad y proliferación de los ovocitos (Kang *et al.*, 2000; Fabioux *et al.*, 2005; Chávez-Villalba *et al.*, 2008; Rodríguez-Jaramillo, 2014).

Las principales moléculas de reserva son lípidos como los ácidos grasos altamente insaturados (HUFAS) y los carbohidratos, así como otras moléculas energéticas que se almacenan por lo regular en diferentes células somáticas. Los HUFAS cumplen un papel importante durante la vitelogénesis y son almacenados en tejidos del músculo, glándula digestiva y manto, durante periodos de abundante disponibilidad de alimento (Gabbott y Peek, 1991; Mathieu y Lubet, 1993). La acumulación de carbohidratos y glucógeno se realiza en manto, músculo aductor y tejido conectivo (Berthelin *et al.*, 2000), mientras que los triglicéridos y el colesterol se almacenan en la glándula digestiva y tienen un rol estructural o energético para los ovocitos

durante el proceso de gametogénesis (Racotta *et al.*, 2003; García-Corona, 2018). Los carbohidratos, el glucógeno, los triglicéridos y el colesterol almacenados en los tejidos proporcionan la energía necesaria para el desarrollo de los ovocitos y espermatozoides, así como para el proceso de liberación y fertilización de los gametos. La gametogénesis, el proceso mediante el cual se forman los gametos, requiere una cantidad significativa de energía. Los nutrientes almacenados también influyen en la calidad de los gametos producidos. Un adecuado almacenamiento de lípidos y nutrientes en los ovocitos contribuye a incrementar la viabilidad y desarrollo de los embriones resultantes. Por lo anterior, un incremento en carbohidratos y lípidos neutros en tejidos de reserva se pueden asociar a una mejor condición reproductiva en moluscos bivalvos. Estos incrementos pueden ser logrados mediante el uso de alimento de alta calidad y el uso de compuestos que permitan una mayor asimilación de los nutrientes contenidos en la dieta (Racotta *et al.*, 2003; Rodríguez-Jaramillo, 2014).

2.5.2 Desarrollo gonádico y vitelogénesis en *Crassostrea spp.*

La gónada de los moluscos ostreidos, es un órgano compuesto por dos lóbulos (derecho e izquierdo), con una estructura acinosa y se encuentran situados entre el epitelio exterior del manto y la glándula digestiva (Eckelbarger y Davis, 1996). En *C. virginica*, los acinos proliferan desde el tejido conectivo del manto hasta la glándula digestiva (Rodríguez-Jaramillo, 2014). El desarrollo gonádico y periodos de desove está regido por factores ambientales como salinidad, temperatura y disponibilidad de alimento. En zonas tropicales, la temperatura de desove es más prolongada y algunas especies de bivalvos marinos tienen dos periodos largos de madurez parcial y desove. La salinidad es considerada como un factor detonante del desove para algunas especies, ya que valores fuera del rango normal (altos o bajos) están relacionados con las temporadas de desove (Zamora *et al.*, 2003; Baqueiro *et al.*, 2007; Ascencio *et al.*, 2016).

Los diferentes estadios de desarrollo gonádico en moluscos ostreidos han sido ampliamente descritos con algunas diferencias entre especies y básicamente se clasifican como (1) gametogénesis inicial, (2) gametogénesis avanzada, (3) madurez y (4) desove (Zamora *et al.*, 2003; Ezgeta *et al.*, 2020; Góngora *et al.*, 2020). Zamora *et al.* (2003), es uno de los pocos autores que han caracterizado los estudios de madurez de *C. virginica* durante un ciclo anual, estableciendo no cuatro, sino seis estadios de madurez: (1) gametogénesis inicial, (2)

gametogénesis avanzada, (3) madurez, (4) desove, (5) postdesove y (6) reposo. Esta caracterización es semejante a la propuesta para otros moluscos ostreidos con algunas diferencias fisiológicas (Tabla 1). Para *C. virginica*, los estudios descriptivos de sus procesos de desarrollo gonádico acompañado con imágenes histológicas son escasos y con poca descripción a detalle, en comparación con otros estudios de especies taxonómicamente cercanas como *C. gigas* o *C. corteziensis*.

Los eventos reproductivos previamente descritos son modulados por factores endógenos basados en el control neuroendocrino asociado al almacenamiento de nutrientes y a la expresión molecular de genes como el gen *oyster-vasa-like* (*Oyvlg*) (Rodríguez-Jaramillo, 2014), que se expresa en la línea celular germinal, el gen AF2 (Activation Function 2), que es un receptor de andrógenos que modula la reproducción y su expresión puntualiza el nivel de la gametogénesis, e interviene directamente en la proliferación y desarrollo de células germinales, regulando así la reproducción (He *et al.*, 1999; Fabioux *et al.*, 2005; Ascencio *et al.*, 2014). Si las condiciones ambientales, reservas energéticas y disponibilidad de alimento son suficientes, los organismos iniciarán un proceso de vitelogénesis (Fabioux *et al.*, 2004a).

La vitelogénesis se relaciona con un sistema de complejos procesos endocrinos altamente ordenados, que implica la síntesis de compuestos orgánicos en el ovocito, el transporte e incorporación de micro y macromoléculas en la glándula digestiva, así como la integración de macromoléculas sintetizadas en órganos hematopoyéticos y transportadas por la hemolinfa, siendo necesaria una amplia reordenación y priorización de estas reservas al momento de la gametogénesis (Bayne, 1976; Mellinger, 2002; Puinean *et al.*, 2006; Dridi *et al.*, 2007).

La vitelogenina (VTG) es el nombre dado a proteínas glucolipofosfoprotéicas que tienen una función ligante y transportadora de nutrientes a través de la hemolinfa hacia los ovocitos en desarrollo y precursora del vitelo o vitelina, están presentes en una gran variedad de organismos que dan origen a huevo con vitelo. La VTG es sintetizada en la gónada (células foliculares) y en otros tejidos especializados (Osada *et al.*, 2003) y se moviliza por el sistema circulatorio a los ovocitos durante la gametogénesis (Osada *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2012). La síntesis de VTG en moluscos ostreidos está regulada por el estradiol, y éste varía según la

estacionalidad asociada con el ciclo reproductivo, de manera que en hembras el estradiol aumenta con el desarrollo gonádico y disminuye después del desove (Matsumoto *et al.*, 2003; Chong, 2022). Adicionalmente se ha documentado que algunas isoformas de VTG se expresan durante la ovogénesis, contribuyen al desarrollo final de los ovocitos, y se encuentran asociadas a procesos relacionados con el sistema inmune y la cicatrización (Ni *et al.*, 2014; Sun y Zhang, 2015; Sun *et al.*, 2020).

La vitelina (VT) es una glico-lipo-proteína que tiene una estructura macromolecular formada de subunidades heterogéneas, así como inclusiones lipídicas y de carbohidratos, siendo su sitio de síntesis los ovocitos (Ijiri *et al.*, 2011). La vitelina se forma a partir de cortes proteolíticos de la vitelogenina introducida por endocitosis al ovocito y procesada por enzimas proteolíticas para producir fragmentos proteicos más pequeños y mediante glicosilación se adicionarán polisacáridos y proteínas que formarán la VT, para su almacenamiento en el ooplasma de los ovocitos en forma de gránulos vitelinos (Chen *et al.*, 2004). Al igual que en la vitelogenina, la abundancia de la vitelina en los ovocitos está relacionada con factores abióticos y bióticos (Liu *et al.*, 2008). Los gránulos de vitelo presentan su mayor concentración en ovocitos postvitelogénicos, a diferencia de los ovocitos vitelogénicos que presentan una menor concentración, de lo cual se infiere que el crecimiento de los ovocitos (área y diámetro) dependerá de la acumulación de VT durante la vitelogénesis (Suzuki *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1998).

La cuantificación de la relación VTG/VT se considera un indicador de madurez gonádica para varias especies de ostreidos como *C. gigas* y *C. corteziensis*, debido a que el crecimiento de los ovocitos es sincrónico con la acumulación de VT, indicando que el crecimiento de los ovocitos depende de la acumulación de VT en el ooplasma (Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2008; Arcos-Ortega *et al.*, 2009), esta acumulación de VT también ha mostrado una relación directa con el área y diámetro del ovocito (Li *et al.*, 1998; Saout *et al.*, 1999; Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2008; Arcos-Ortega *et al.*, 2009). La detección y cuantificación molecular de la VTG en hemolinfa en varios grupos de organismos como moluscos y crustáceos, se ha propuesto como un predictor de la maduración gonadal, debido a que su concentración en hemolinfa aumenta en relación con la maduración gonadal (Arcos-Ortega *et al.*, 2011). Su cuantificación es un buen indicador de maduración gonádica para ostreidos, ya sea que se apliquen técnicas histoquímicas o

moleculares (Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2008; Arcos-Ortega *et al.*, 2009; Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2014; Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2021; Fernández-González *et al.*, 2021).

2.5.3 Indicadores de calidad ovocitaria y reproductiva

Los indicadores de calidad ovocitaria y reproductiva constituyen una herramienta cuantitativa esencial, que posibilita la cuantificación y la comparación estadística de la condición reproductiva en moluscos. Esta herramienta se suma de manera complementaria a la caracterización de los estadios de desarrollo gonádico tradicionalmente utilizados en ostras como *C. gigas* y *C. corteziensis*, y en mitílidos como *M. capax* (Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2008; García-Corona, 2014; Ezgeta *et al.*, 2020; Góngora *et al.*, 2020). El análisis comparativo de la frecuencia de los diferentes estadios de desarrollo ovocitario permite identificarlos como valores cuantitativos porcentuales, ampliamente usados en varias especies de ostreidos como: *C. corteziensis* y los resultados de Rodríguez-Jaramillo *et al.* (2008) y Rodríguez-Jaramillo *et al.* (2020) mostraron bajo varias condiciones experimentales, que son buenos indicadores de desarrollo ovocitario y gonádico en ostreidos. El análisis del diámetro teórico (DT) y la relación núcleo/citoplasma (N/C) de los ovocitos ha permitido evaluar la acumulación de reservas energéticas asociadas a su crecimiento alométrico y la calidad ovocitaria en *M. capax* (García-Corona, 2014), *C. corteziensis* (Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2008) y *C. gigas* (Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2017). El incremento o decremento de DT y de la relación N/C puede ser directamente relacionado con el contenido de lípidos y proteínas en el ooplasma (Gómez-Robles *et al.*, 2013).

El análisis conjunto de estos indicadores ovocitarios y de indicadores morfofisiológicos como el área de cobertura de la glándula digestiva, altura de los túbulos digestivos, cuantificación de triglicéridos y fosfolípidos, ha sido previamente usado en bivalvos marinos como *M. capax* (García-Corona, 2014), *C. corteziensis* (Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2008) y *C. gigas* (Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2017), lo cual sugiere que serán de gran utilidad para conocer la condición energética-alimentaria y reproductiva de *C. virginica* (Fig. 5; Tabla 1).

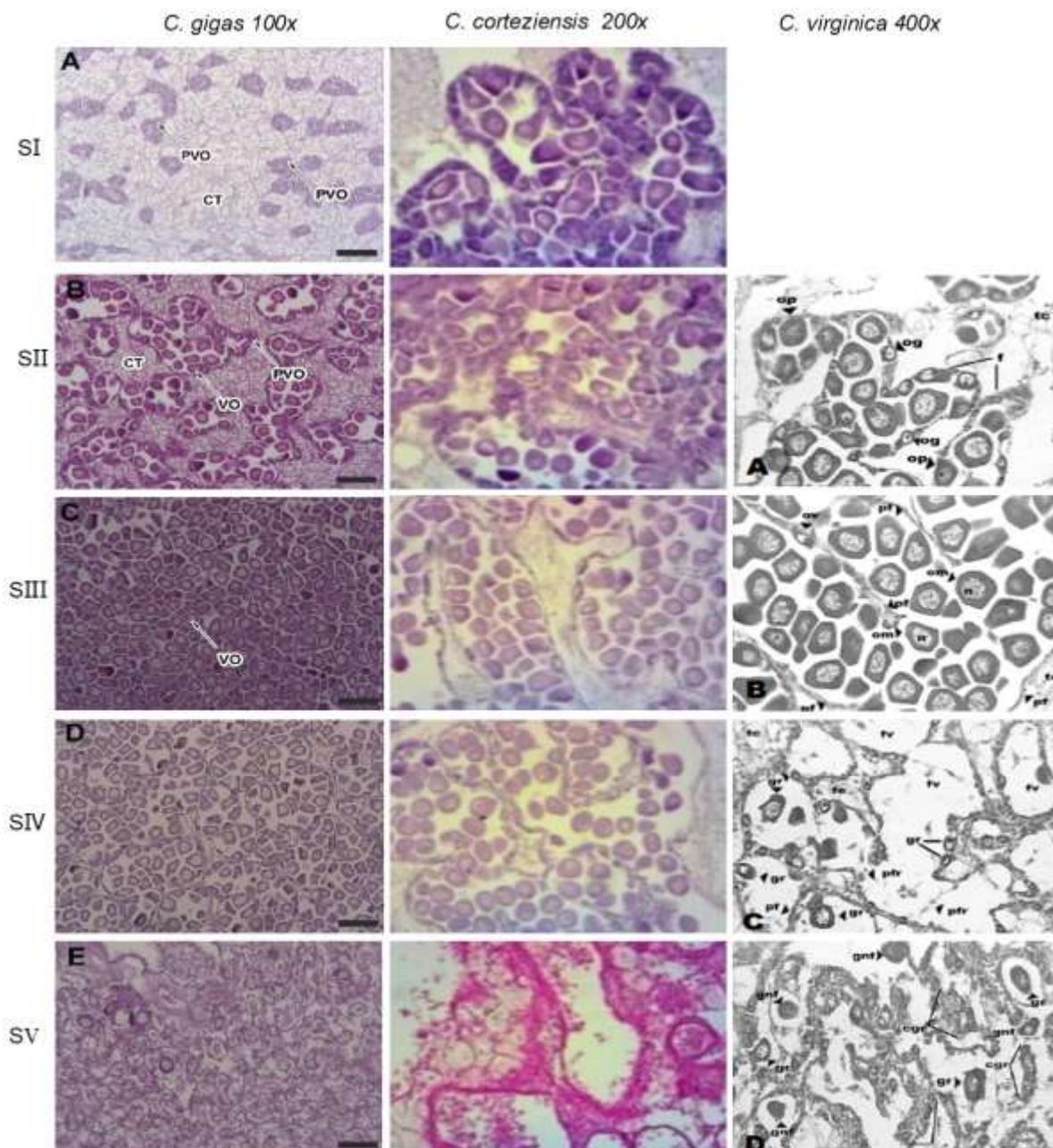


Figura 5.- Imágenes histológicas que muestran los estadios de desarrollo gonádico de hembras de *C. gigas*, *C. Corteziensis* y *C. virginica*. SI (gametogénesis inicial o previtelogénesis), SII (gametogénesis avanzada o vitelogénesis), SIII (madurez o postvitelogénesis), SIV (desove), SV (postdesove o reposo) de *C. gigas*, PVO (ovocitos previtelogenicos), VO (ovocitos vitelogenicos), CT (tejido conectivo). *C. corteziensis* y *C. virginica*, egr (concentración de gametos residuales), f (folículos), fv (folículo vacío), gnf (gameto no funcional), gr (gameto residual), op (ovocito primario), om (ovocito maduro), pf (pared folicular), pfr (pared folicular rota), tc (tejido conectivo), n (núcleo). Tomado de Ezgeta *et al.* (2020); Góngora *et al.* (2020); Zamora *et al.* (2003).

Tabla 1.- Descripción de los diferentes estadios de desarrollo gonádico en *Crassostrea gigas*, *Crassostrea corteziensis* y *Crassostrea virginica*.

	<i>C. gigas</i> (Ezgeta <i>et al.</i> , 2020)	<i>C. corteziensis</i> (Góngora <i>et al.</i> , 2020)	<i>C. virginica</i> (Zamora <i>et al.</i> , 2003)
Indiferenciado	No hay evidencia de presencia de Folículos o solo folículos pequeños, la determinación del sexo no fue posible.	Se pueden observar folículos vacíos con ovocitos residuales que pueden reabsorberse o permanecer hasta la siguiente maduración; se encuentra abundante tejido conjuntivo y actividad fagocítica.	El tejido conjuntivo inicia su desarrollo hasta constituir una gruesa capa. Puede presentarse invasión fagocitaria.
Previtelogénesis o gametogénesis inicial	Oogonios que surgen de las células germinales a lo largo de los folículos son ovocitos libres. El tejido conectivo es abundante.	Se observa actividad gametogénica vesicular en el tejido conjuntivo, así como ovocitos inmaduros adheridos a la pared del folículo y pocos ovocitos maduros en el gonoducto.	Ovocitos maduros a la luz del túbulo. Ovocitos inmaduros adheridos a la pared folicular.
Vitelogénesis o gametogénesis avanzada	Ovocitos libres y adheridos, con núcleos distintivos que se tiñen de color más claro que el citoplasma.	Abundantes ovocitos dispuestos a la luz de los folículos grandes y anastomosados. Las paredes foliculares son delgadas. El posible diferencias oogonios, en los acinos predominan los ovocitos grandes en forma de pera.	Folículos grandes y anastomosados, presentan una relación íntima con sus membranas basales. Ovocitos maduros predominantes, gran actividad del epitelio germinal.
Postvitelogénesis O madurez	Ovocitos vitelogénicos libres con núcleo diferenciado y nucleolo.	Ovocitos grandes, redondos o poligonales y se han desprendido de la pared folicular. Citoplasma abundante y granular. Tejido conectivo interfolicular reducido por el crecimiento de los folículos.	Ovocitos maduros de formas poliédricas y redondas en corte transversal, desprendidos de la pared folicular. Ovocitos con citoplasma abundante y granular, membrana nuclear delimitada.
Desove	Aparece una gran cantidad de ovocitos libres, pero no densamente compactados, ocupando el centro de la luz en el folículo.	Los folículos se rompen y se liberan los ovocitos postvitelogénicos, dejando espacios en la gónada. Se puede observar un desove parcial.	Tejido roto, expulsión de los gametos, disminución de la zona ocupada por la gónada y disminución de los ovocitos en los folículos.
Postdesove	Las paredes de los folículos parecen rotas y los folículos están vacíos. Los ovocitos residuales están en proceso de citólisis.	Cese de la expulsión de los ovocitos. Se aprecian grandes espacios vacíos en la gónada con restos de ovocitos. Los folículos se rompen con la actividad fagocítica en sus paredes.	Incremento de gametos no funcionales, núcleo y nucleolo no definidos claramente, aumento de celular del tejido conectivo vesicular.

2.6 Sistema inmunitario de moluscos bivalvos

Los moluscos bivalvos carecen de un sistema inmune adaptativo, comúnmente presente en los vertebrados, pero poseen sistemas inmunitarios innatos, con cierto nivel de especificidad y memoria (Song *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2014; Moreira *et al.*, 2019). Las reacciones inmunitarias innatas pueden dividirse en tres fases: (1) reconocimiento, (2) cascadas de señalización y (3) producción y/o liberación de efectores (Janeway, 1994; Allam y Pales, 2015).

La diferenciación entre lo propio y lo ajeno es un paso importante en la inmunidad innata; este reconocimiento y/o adhesión, permite iniciar procesos de destrucción de patógenos, células y/o moléculas que son una amenaza para el organismo. El reconocimiento de lo propio por el sistema inmunitario, incluyendo microorganismos, puede agruparse en tres grupos moleculares: moléculas secretadas, receptores de superficie celular y receptores de citoplasma, que está implicado en el reconocimiento de “MAMP_s” (microbe-associated molecular patterns, por sus siglas en inglés) y “DAMP_s” (damage-associated molecular patterns, por sus siglas en inglés). Entre los principales receptores están los “PRR” (pattern recognition receptor, por sus siglas en inglés) conformados por proteínas disueltas o asociadas a la superficie celular microbiana, son capaces de identificar MAMP_s /DAMP_s, presentes en diferentes grupos de microorganismos, como lipopolisacáridos bacterianos y peptidoglicanos o glucanos fúngicos, (Fig. 7) (Ford, 2001; Song *et al.*, 2010; Allam y Pales, 2015).

En moluscos ostreidos se ha identificado una gran cantidad de receptores PRR en la mucosa de los órganos paliales (manto, branquia, glándula digestiva, palpos labiales) como proteínas de reconocimiento de peptidoglicanos (PGRP), lectinas y proteínas, que contienen tioéster (TEP) (Venier *et al.*, 2015; Mukherjee *et al.*, 2014). Las proteínas de reconocimiento de peptidoglicanos se han identificado en transcritos obtenidos de secreciones de mucosa de los órganos paliales de *C. virginica* (Pales-Espinosa *et al.*, 2014a) que codifican PGRP, expresándose específicamente en tejido mucoso. Se ha sugerido que cumplen un papel de reconocimiento bacteriano, observando que las secuencias de PGRP expresadas en manto y branquias de *C. gigas* contienen dominios β -defensin-like (un péptido antimicrobiano) actuando como proteínas antimicrobianas, contribuyendo a la capacidad de respuesta inmune en las mucosas, ante invasiones bacterianas (Itoh y Takahashi, 2008).

Otras proteínas de reconocimiento como, HdPRP (*Haliotis discus pattern recognition protein*), identificados en abulón *Haliotis discus discus* (Nikapitiya *et al.*, 2014), se han agrupado con otras proteínas de reconocimiento en moluscos como: peptidoglicanos de *Biopharia glabrata* “BgGRP” (*Biomphalaria glabrata* peptidoglycan recognition proteins) y lipopolisacáridos de *Chlamys ferrerii* “CfLGBP” (*Chlamys ferrerii* lipopolysaccharides and peptidoglycans-binding protein). Estos PRR se expresan principalmente en branquias, siendo menor su expresión en manto y glándula digestiva, su expresión en los órganos paliales sugiere una amplia incursión en la inmunidad de la mucosa de moluscos bivalvos marinos (Allam y Pales, 2015).

Particularmente, las lectinas tienen un papel significativo en el reconocimiento inmunológico a nivel de las mucosas; el término lectina se utiliza para una amplia gama de proteínas y glicoproteínas de unión a carbohidratos, organizadas como homo-oligómeros o hetero-oligómeros de subunidades polipeptídicas, unidas de forma no covalente que muestran varios dominios de reconocimiento de carbohidratos “CRD” (carbohydrate-recognition domains), que se unen a ligandos de azúcar correspondientes, por lo general a monosacáridos u oligosacáridos (Vasta, 2009). Estas lectinas se unen a los carbohidratos presentes en la superficie celular de microorganismos, aglutinando y potenciando la destrucción de microbios por células inmunitarias especializadas (Olafsen, 1986; Pales-Espinosa *et al.*, 2009; Pales-Espinosa *et al.*, 2010b; Pales-Espinosa *et al.*, 2011).

Estudios previos han identificado a varias lectinas tipo C en los transcriptomas de *C. virginica* (CvML) (Jing *et al.*, 2011); estos estudios transcriptómicos confirman que CvML (*C. virginica* Mucocyte Lectin), se localizó en los mucositos que recubren el epitelio de los órganos paliales (Fig. 6), a diferencia de *C. gigas*, especie en la cual se expresan solamente en glándula digestiva (Yamura *et al.*, 2008). En ambos casos, los niveles de lectina aumentan con la inanición de los bivalvos, de lo que es posible inferir que estas moléculas también están involucradas en la captura y selección de partículas de alimentos (Pales-Espinosa *et al.*, 2010b; Jing *et al.*, 2011).

Otros estudios sugieren que incrementos de la expresión de lectinas en *C. virginica* está asociado a la exposición de *Vibrio alginolyticus*, pero no a una infección y/o a su presencia en el

sistema circulatorio; por ello, es posible asumir que estas lectinas solo responden a señales externas asociadas a microorganismos en la cavidad palial, ejemplificando su destacado papel en la inmunidad de moluscos (Jing *et al.*, 2011). Sin embargo, esto plantea la hipótesis de que las lectinas estarían involucradas en el reconocimiento de bacterias simbióticas y de patógenas por igual (Allam *et al.*, 2014). Tanto en los tejidos como en las secreciones de las mucosas de moluscos, se ha localizado e identificado un gran repertorio de lectinas que parecen variar con el ciclo reproductivo y con las condiciones fisiológicas generales del organismo (Pales y Allam, 2013).

Los receptores tipo Toll, (“Toll-like receptors” TLR), también se encuentran entre las familias más importantes de los PRR; son receptores transmembranales, caracterizados por la presencia de repeticiones extracelulares ricas en leucina y en vertebrados son expresados en células inmunes centinelas como células dendríticas y macrófagos (Vijay-Kumar *et al.*, 2010; Allam y Pales, 2015). En moluscos bivalvos marinos se han identificado TLR (Tanguy *et al.*, 2004; López-Carvallo *et al.*, 2020), los cuales se expresan mayormente en hemocitos circulatorios. Igualmente, se ha informado que los TLR tienen una amplia distribución tisular y se expresan en gran medida en órganos paleales que están en contacto directo con microorganismos (Zhang *et al.*, 2011; Allam y Pales, 2015). Aunado a lo anterior la regulación de los TLR se ha visto positivamente en tejidos de órganos paliales después de un desafío infeccioso (Perrigault *et al.*, 2009).

Los hemocitos son las células de la hemolinfa más importantes en la respuesta inmune de los moluscos bivalvos marinos, viajan a través de su sistema circulatorio abierto (Loker, 2010; Song *et al.*, 2010). Los hemocitos participan en la fagocitosis y encapsulación de microorganismos extraños, cicatrización, digestión y transporte de nutrientes, reproducción y excreción (Lokert, 2010). Aunque se sabe poco sobre la formación de hemocitos en bivalvos marinos, así como del órgano hematopoyético, se ha hipotetizado que los hemocitos se pueden producir a partir de la diferenciación células de tejido conectivo (Rodríguez-Jaramillo, 2014). La quimiotaxis es una de las características más importantes de los hemocitos frente a microorganismos, este movimiento quimiotáctico, es el primer paso en el proceso de defensa de partículas reconocidas como no propias, precediendo a la endocitosis (Bugge y Allam, 2007).

Adicionalmente, el sistema inmunitario innato de moluscos bivalvos marinos está controlado por una red de señalización activada ante una infección y otros estímulos (Fig. 7). Estas activaciones desencadenan una cascada de reacciones y respuestas inmunitarias sistémicas dirigidas a eliminar patógenos (Song *et al.*, 2010). Entre las principales vías de regulación en moluscos se encuentran: nuclear factor kappa B pathway (NF- κ B), mitogen-activated protein kinase pathway (MAPK), Janus kinase/signal transducers and activators of transcription pathway (JAK-STAT) y Toll-like receptor (TLR) (Loker, 2010; Song *et al.*, 2010). NF- κ B está relacionado con inmunidad, apoptosis, mecanismos homeostáticos y diferenciación celular (Li y Stark, 2002); en particular, NF- κ B está involucrado en la regulación de citocinas, péptidos antimicrobianos e inhibidores de la apoptosis (Allam y Pales, 2015). MAPK y JAK-STAT están relacionados con procesos de crecimiento, diferenciación y muerte celular (Arthur y Ley, 2013). Sin embargo, aún se tiene poca información acerca de sus funciones y regulación de efectores en moluscos, así como su papel preciso en factores inmunitarios (Allam y Pales, 2015).

La mucosa de moluscos se compone de glicoproteínas y polisacáridos que constituyen una capa de retención de moléculas efectoras (Denny, 1989). Entre las moléculas efectoras identificadas en los moluscos se encuentran las lisozimas y proteasas (Itoh *et al.*, 2007), las enzimas antioxidantes (Orbea *et al.*, 2000), las proteínas de choque térmico, las metalotioneínas (Moraga *et al.*, 2005) y los péptidos antimicrobianos (Peters *et al.*, 2010).

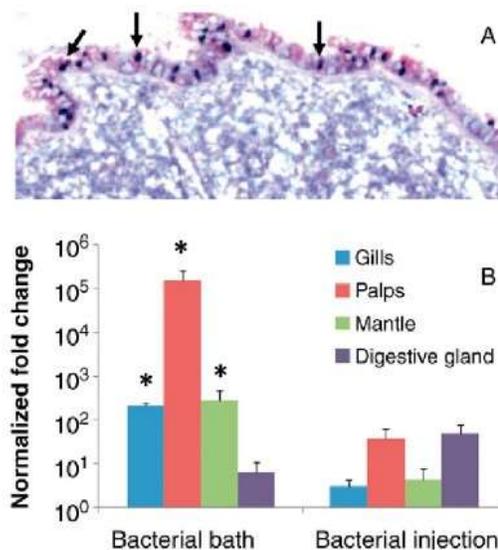


Figura 7.- A. Detección de lectina de mucosito de *Crassostrea virginica* (CvML; flechas) que recubren el epitelio del manto, mediante hibridación in situ, utilizando sondas de ARNc específicas. B. Determinación de la expresión relativa de CvML (escala logarítmica, normalizada a 18S) en diferentes órganos por qRT-PCR después de la exposición a *Vibrio alginolyticus* (*) indica una expresión significativamente mayor (prueba t, $p < 0.05$). Tomado de Allam y Pales (2015).

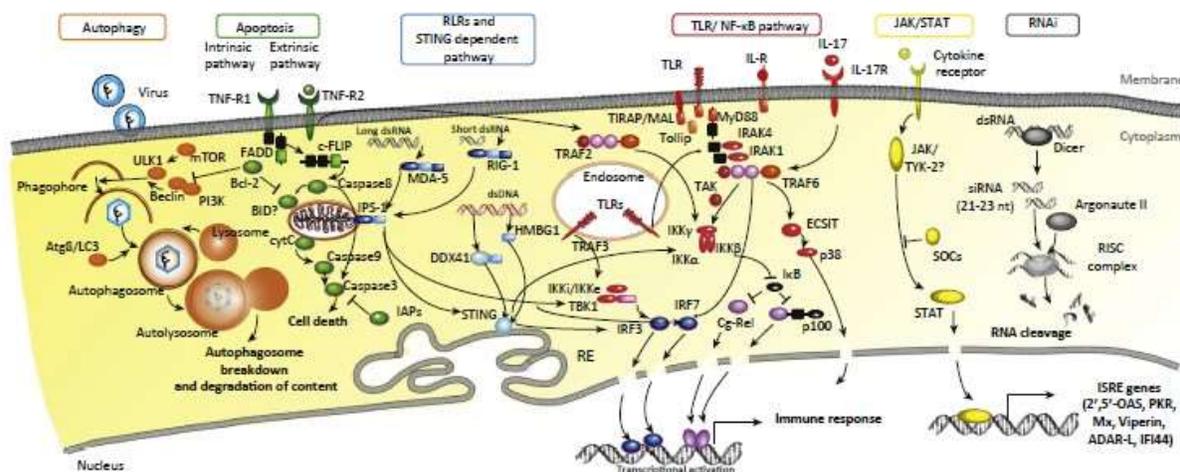


Figura 6.- Esquema ilustrativo de las cascadas de señalización para modular la respuesta inmune en moluscos bivalvos. Tomado de Escoubas *et al.* (2016).

Dentro de los efectores de la respuesta inmune en bivalvos se encuentra el glutatión S-transferasa (GST) esta enzima se encuentra en muchos organismos, incluidos los moluscos bivalvos y tiene un papel importante en la desintoxicación de xenobióticos y radicales libres, por lo que ayuda a reducir el estrés oxidativo en las células. Esta detoxificación se realiza principalmente a través de la conjugación de glutatión con xenobióticos y/o endobióticos, convirtiéndolos en compuestos más solubles capaces de ser eliminados por el organismo (Oakley *et al.*, 2015; Badillo *et al.*, 2014).

2.7 Compuestos Bioactivos Altamente Diluidos (CBAD)

En la acuicultura se han utilizado diferentes alternativas eco-sustentables al uso de antibióticos como los probióticos, prebióticos, simbióticos, para-probióticos y post-bióticos con funciones inmunoestimulantes (Mazón-Suástegui *et al.*, 2018; Abasolo-Pacheco *et al.*, 2020), extractos naturales de plantas o aceites esenciales con efectos anti-bacteriales o antifúngicos (Romero *et al.*, 2012), compuestos derivados de bacterias que pueden ser toxinas o bacterias inactivadas, beta-glucanos, peptidoglucanos o lipopolisacáridos (Lin *et al.*, 2011; Meena *et al.*, 2013), nanopartículas de plata (Tello-Olea *et al.*, 2019) y compuestos bioactivos altamente diluidos (CBAD) con acción inmunoestimulante.

Estos últimos son desarrollados a partir de materiales de origen vegetal, mineral o animal, incluyendo venenos, tejidos enfermos, excreciones, secreciones, y lisados de agentes bacterianos patógenos altamente virulentos que han sido inactivados. Partiendo de este concepto los CBAD se también incluyen a los medicamentos homeopáticos autorizados por la Secretaría de Salud de México para uso humano, y otras formulaciones sin registro oficial como medicamento, pero igualmente elaborados conforme a la farmacopea homeopática (Secretaría de Salud, 2015; Mazón-Suástegui *et al.*, 2018a; Morales-Sánchez, 2023), es decir sometidas a un procedimiento de dilución serial (Decimal 1:9, Centesimal 1:99, Miliesimal 1:999, y mayor) alternado con agitación enérgica o sucusión, cuyo objetivo es la dinamización del producto final resultante (Mazón-Suástegui *et al.*, 2018a).

Aunque la aplicación de los CBAD en la acuicultura es reciente, se sabe que la aplicación de algunos medicamentos homeopáticos de uso humano y de algunos productos homeopáticos desarrollados por el CIBNOR (ViP, ViA), han tenido efectos positivos y medibles a nivel molecular, celular y fisiológico, que se traducen en cambios cuantificables en el crecimiento, supervivencia, estimulación del sistema inmune y respuesta productiva en diversos organismos marinos y dulceacuícolas con importancia comercial (Ortíz-Cornejo *et al.*, 2017; Rosero García, 2017; García-Corona, 2018; Rosero-García *et al.*, 2019; Mazón-Suástegui *et al.*, 2019b, López-Carvallo, 2020; López-Carvallo *et al.*, 2021).

La elaboración de los CBAD se basa en la concepción médica de la homeopatía propuesta por Samuel Christian Friedrich Hahneman (1755-1843) con el fundamento “lo similar es curado por lo similar” (“*similia similibus curentur*”, en latín) y en el efecto dosis- respuesta denominado “Hormesis” (Bellavite *et al.*, 2006; López-Días *et al.*, 2013; Mazón-Suástegui *et al.*, 2018). Al respecto, las bases conceptuales, usos y aplicaciones de la medicina homeopática han tenido una evolución interesante durante los últimos años, e incluso se ha propuesto denominarla “Adaptive Network Nanomedicine” (Bell y Schwartz, 2015).

La elaboración de los CBAD inicia a partir de un concentrado inicial o Tintura madre “TM” de un compuesto (Fig. 8) seguido de diluciones seriales alternadas con agitación (también llamada “sucusión”), lo que permite obtener ultra-diluciones con una concentración muy baja (Tabla 2) pero suficiente para incitar diferentes respuestas fisiológicas, genómicas y transcriptómicas en los organismos tratados (Bellavite *et al.*, 2006).

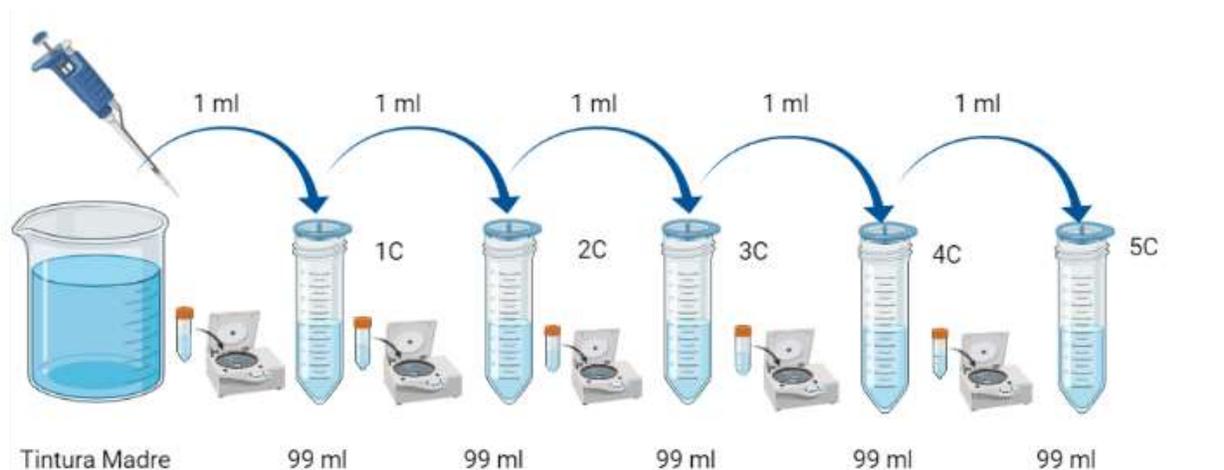


Figura 8.- Diagrama ilustrativo del proceso de elaboración de los compuestos bioactivos altamente diluidos (CBAD). Tintura madre (TM): concentrado original del compuesto a partir del cual se realizan diluciones seriales alternadas con agitación o succusión.

Tabla 2.- Concentración del principio activo TM en las diferentes diluciones homeopáticas usadas en acuicultura, centesimal (C) o decimal (D).

Dilución homeopática	Dilución	Dosificación AQ	Organismos
7C	$1:10^{-14}$	$100 \mu\text{L}^{-1}$	Peces, crustáceos y moluscos
31C	$1:10^{-62}$	$100 \mu\text{L}^{-1}$ $3 \mu\text{L}^{-1}$	Moluscos y peces
30C	$1:10^{-60}$	$100 \mu\text{L}^{-1}$	Moluscos y peces
6C	$1:10^{-12}$	$100 \mu\text{L}^{-1}$	Peces, crustáceos y moluscos
1D	$1:10^{-1}$	$100 \mu\text{L}^{-1}$	Moluscos

2.7.1 Interacciones de los CBAD con los sistemas biológicos

Los aspectos farmacodinámicos de los CBAD en los sistemas biológicos han sido hipotetizados en respuesta a la pregunta ¿Cómo interactúan estos compuestos sobre los sistemas biológicos? Al respecto, Bellavite *et al.* (2014) identificaron “blancos” biológicos, mediante la interacción fármaco-receptor en la membrana citoplásmica, a través de mecanismos de transmisión y amplificación de la señal del fármaco y propuso un modelo hipotético (Fig. 9), en el cual se

proponen tres hipótesis principales que explican la naturaleza del “compuesto activo” con el cual el sistema biológicos interactúan: (A) agrupaciones o “clusters”, de moléculas de agua, (B) electrodinámica cuántica, y (C) formación de nanopartículas del soluto original que permanece después de la dilución y actúan en asociación con el solvente, que por lo regular es una solución hidroalcohólica (Bellavite *et al.*, 2014b; López-Carvalho, 2020). Adicionalmente, se establece que las moléculas de la sustancia o “principio activo” presente en la TM, pueden actuar como ejes de nucleación, potenciando la formación de estructuras supramoleculares mediante el reordenamiento de las moléculas del solvente.

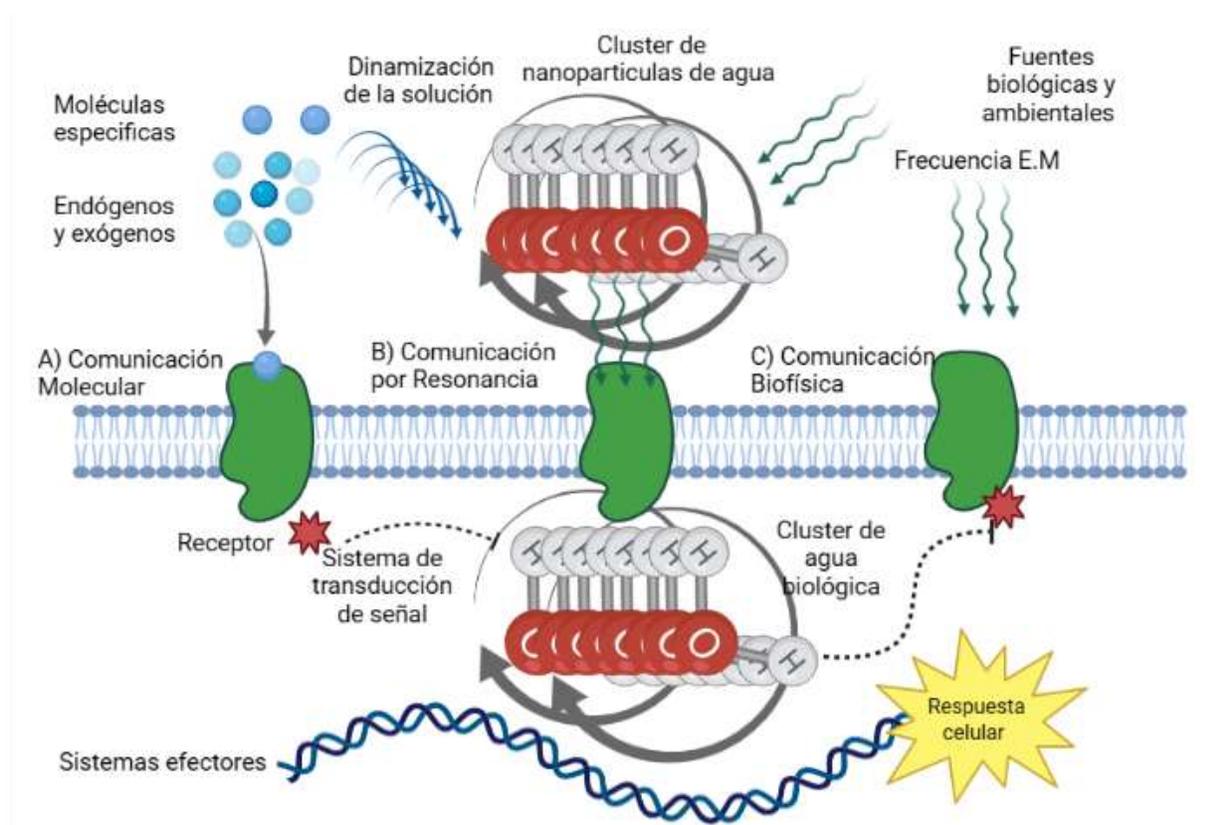


Figura 9.- Diagrama hipotético propuesto por Bellavite *et al.* (2014) para explicar la interacción de medicamentos homeopáticos (CBAD) con los sistemas biológicos: (A) interacción molécula-receptor de membrana; (B) interacción de resonancia electromagnética; (C) regulación biofísica de la respuesta de los receptores de membrana.

Actualmente, la hipótesis que ha tomado mayor relevancia para explicar la interacción de los CBAD con los sistemas biológicos es la formación de nanopartículas, ya que se ha podido demostrar su presencia en los medicamentos homeopáticos, aplicando técnicas DLS y Espectroscopía de Absorción UV-Vis (Hoo *et al.*, 2008; Tomaszewska *et al.*, 2013). Estos estudios han establecido que el método de preparación de fármacos en homeopatía es muy parecido al método moderno de trituración y molienda “Top-Down” (Oh *et al.*, 2021), utilizado en nanotecnología para producir nanopartículas (NP). Es importante destacar que al analizar medicamentos homeopáticos (CBAD) se han encontrado nanopartículas en todas las dinamizaciones o “potencias” comúnmente utilizadas en medicina homeopática (Konovalov *et al.*, 2014; Rajendran, 2019). La presencia del “principio activo” inicialmente presente y medible en la TM original en forma de NP en potencias altas de fármacos metálicos y minerales, puede ayudar a comprender la acción terapéutica de los CBAD (Rajendran, 2015).

Las interacciones entre nanopartículas o (NP) y los sistemas biológicos (NP-SB) son complejas, dinámicas y multiparamétricas (Von-Roemeling *et al.*, 2017). Existe una gran cantidad de factores que incrementan la complejidad de la interacción NP-SB, tales como: las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas, su tamaño, forma química superficial, composición, arquitectura, densidad, pH, entorno bioquímico y cinética química (KE *et al.*, 2017). Esto plantea grandes retos para el diseño de CBAD en acuicultura y magnifica la importancia de continuar la investigación de estos biofármacos acuícolas.

Igualmente se ha documentado ampliamente que las características fisicoquímicas y biofísicas de las nanopartículas pueden ser cambiadas mediante su interacción con un fluido (vehículo de dilución), o al estar en contacto con un entorno biológico (Mahmoudi *et al.*, 2016; Hühn *et al.*, 2017). En el caso de CBAD, la acción de las NP se potencia mediante la agitación intensa o sucusión, también conocida como “dinamización” o “potenciación”. Las NP presentan una interacción para estabilización de sus cargas porque toda molécula tiende a la estabilidad; a esta interacción se le conoce como solvatación (Fig. 10; Fig. 11) y ocurre solo en fluidos como el agua y el alcohol (Cataliotti *et al.*, 2009; Kim y Yeom, 2014).

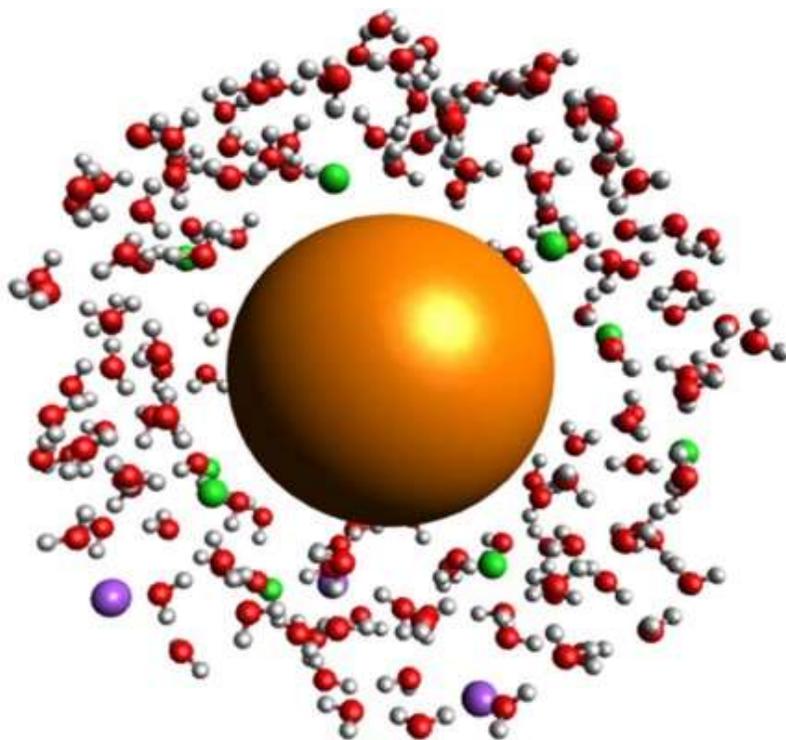


Figura 11.- Modelo general de la interacción de una nanopartícula con una molécula de agua, generando el proceso de solvatación. Fuente: Kim y Yeom, (2014).

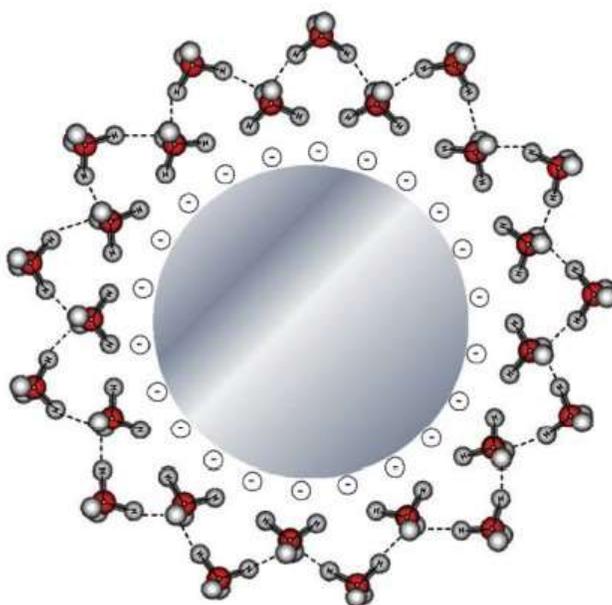


Figura 10.- Modelo de interacción entre nanopartículas de plata y agua (solvatación). Fuente: Cataliotti *et al.* (2009).

Cuando las nanopartículas son introducidas a los sistemas biológicos, éstas se encuentran en un fluido orgánico corporal donde la corona de solvatación previamente formada interactuará con las moléculas disponibles (como proteínas), para formar la conocida corona proteica (Fig.12). Esta corona proteica formada alrededor de la NP cambiará sustancialmente sus propiedades iniciales otorgándole una identidad biológica, siendo esa nueva identidad la que determinará un modelo específico de interacción con los sistemas biológicos (Monopoli *et al.*, 2012; Caracciolo, 2015; Zhdanov y Cho, 2016; Xiao y Gao, 2018).

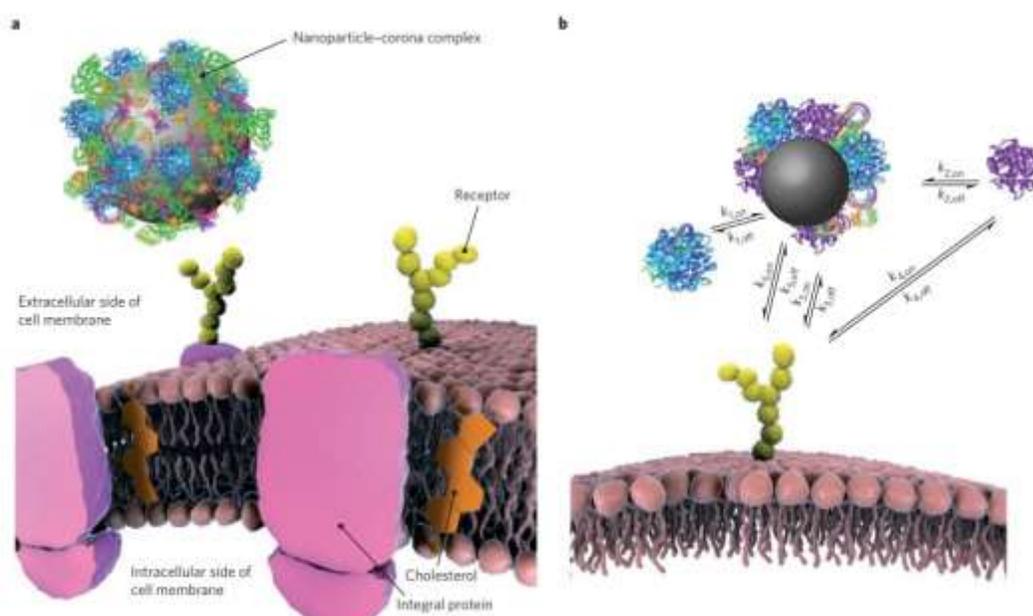


Figura 12.- Complejo nanopartícula-corona en un entorno biológico. Fuente: Monopoli *et al.* (2012), [Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials].

En la figura 12, se observa que el complejo nanopartícula-corona interactúa con la maquinaria biológica con un receptor de membrana celular específico, mediante procesos en ambas direcciones (on/off), para una nanopartícula específica interactuando con un receptor también específico. Las biomoléculas del medio se adsorben fuertemente en la superficie desnuda de la nanopartícula (k_1), formando una capa estrechamente unida de biomoléculas, la corona “dura”, en contacto inmediato con la nanopartícula. Otras biomoléculas, como la corona “blanda”, tienen una afinidad residual con el complejo nanopartícula-corona dura (principalmente con la propia corona dura), pero es mucho menor, por lo que esas moléculas se intercambian rápidamente (k_2). Si una biomolécula tiene una vida suficientemente larga en la corona, puede

conducir al reconocimiento del complejo nanopartícula-corona como un todo por parte de un receptor de membrana celular (k3). La misma biomolécula sola también puede ser reconocida por el receptor (k4). Finalmente, si está presente, la superficie desnuda de la nanopartícula también puede interactuar con los receptores de la superficie celular (k5) u otros constituyentes de la membrana.

La captación de nanopartículas involucra una serie de mecanismos altamente regulados para superar la resistencia celular “membrana plasmática”, es importante saber cómo ingresan las NP en las células ya que las vías de captación subyacentes determinan su función, su destino intracelular y su respuesta biológica (Chen *et al.*, 2011; Panariti *et al.*, 2012). Considerando la disponibilidad de múltiples rutas de entrada celular para las NP durante la exposición celular *in vivo* (“endocitosis”) e *in vitro* (“entrada celular directa”), la vía de la endocitosis se puede clasificar en cinco clases mecánicamente diferentes: endocitosis dependiente de clatrina y caveolina; endocitosis independiente de caveolina y clatrina; fagocitosis y macropinocitosis. Existen múltiples vías para la entrada celular de NP a través de mecanismos de endocitosis: (a) dependiente de clatrina; (b) dependiente de caveolina; (c) independiente de clatrina y caveolina; (d) fagocitosis; y (e) vías de macropinocitosis (Fig. 13). Estas vías de captación celular de nanopartículas son mecánicamente distintas y altamente reguladas a nivel biomolecular y los efectos biológicos que desencadenan, dependen de los receptores con los cuales interactúan y si es o no internalizada por la célula del organismo tratado (Donahue *et al.*, 2019).

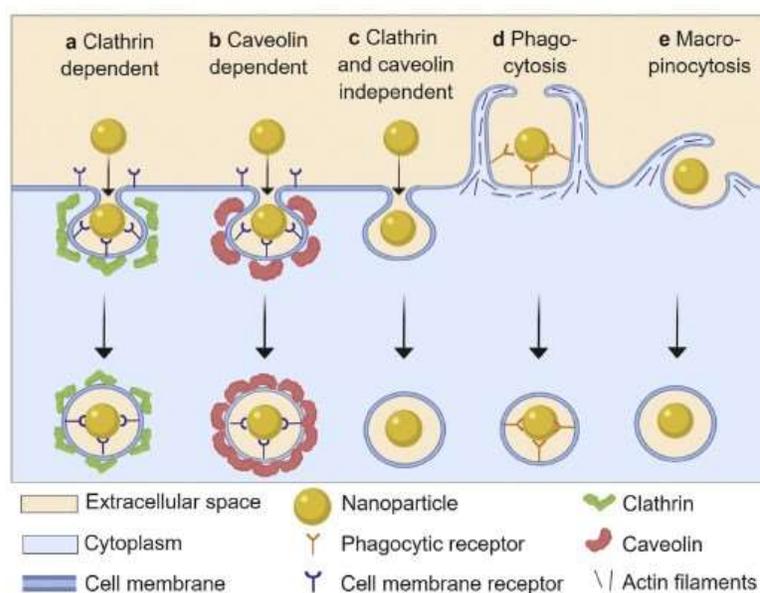


Figura 13.- Vías de captación de nanopartículas por endocitosis. Fuente: Donahue *et al.* (2019), [Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine].

2.7.2 Efecto de los CBAD en organismos de cultivo

Numerosas investigaciones científicas publicadas en revistas indexadas ofrecen evidencia experimental de que la aplicación de los CBAD puede activar diversos procesos fisiológicos en cadena, que generan una mejor condición fisiológica de los organismos cultivados (Fig. 14) (Mazón-Suástegui *et al.*, 2017; López-Carvallo *et al.*, 2020).

En peces como *Seriola rivoliana* y *Lutjanus guttatus* se han utilizado los CBAD (ViP, ViA, SiT, PhA) a diluciones 7^{ma} centesimal, equivalente a una concentración femtomolar [fM], 30^{ma} centesimal, y 31^{ra} centesimal; y se observó un incremento en la acumulación de reservas energéticas, modulación de la respuesta inmune y el incremento de supervivencia en organismos tratados profilácticamente (Mazón-Suástegui *et al.*, 2016a; Mazón-Suástegui *et al.*, 2019a; Rosero-García *et al.*, 2019). En el camarón blanco *Penaeus vannamei* se han utilizado los CBAD (ViP, ViA, SiT, PhA, PaV, Heel-Mix) a dilución 7^{ma} centesimal, equivalente a una concentración femtomolar [fM], y se observó un incremento en la supervivencia, en la respuesta inmune y un mayor conteo de bacterias benéficas (Mazón-Suástegui *et al.*, 2019b; García-Bernal *et al.*, 2020). En

moluscos bivalvos marinos como la almeja catarina *A. ventricosus*, el mejillón café *M. capax*, y el ostión Kumamoto *C. sikamea*, se han aplicado CBAD (ViP, ViA, SiT, PhA, PaV, CaS, HeS) en diluciones 7^{ma} centesimal equivalente a una concentración femtomolar [fM], 30^{ma} centesimal, 31^{ra} centesimal; y se observó un incremento en las reservas energéticas, en la respuesta inmune, supervivencia y calidad ovocitaria (García-corona, 2018; Mazón-Suástegui *et al.*, 2019b; Mazón-Suástegui *et al.*, 2021).

El uso profiláctico de CBAD (PaV, SiT, PhA) en juveniles de Pargo Lunarejo *Lutjanus guttatus*, incrementó significativamente la condición nutricional y respuesta inmune (Rosero-García, 2007). En juveniles de almeja Catarina *A. ventricosus* los CBAD (PhA, SiT, ViP, ViA) mostraron mejoras significativas en la respuesta inmune, un mayor conteo de hemocitos en glándula digestiva, mayor actividad CAT y SOD, así como un incremento en las reservas energéticas (López-Carvallo *et al.*, 2019). En acuerdo con estos resultados, en adultos reproductores de *M. capax*, la aplicación profiláctica de CBAD (SiT, CaS, Hes, PhA, FeP, ZiP, ViP, ViA, ViT) ha favorecido maduración gonádica con incremento de las reservas energéticas, así como una menor proporción de ovocitos atrésicos (García-Corona, 2018). En adultos de *P. vannamei* se ha registrado un mayor crecimiento y supervivencia (Morales-Sánchez *et al.*, 2022), y una disminución de *Vibrio spp.* en hepatopáncreas cuando los organismos son tratados con CBAD (PhA, SiT, PaV, ViT, ViP, ViA) (García-Bernal *et al.*, 2020). En juveniles de la misma especie se obtuvo un aumento de enzimas, incluyendo aminopeptidasas, amilasas, lipasas, tripsina y quimotripsina (Mazón-Suástegui *et al.*, 2019a).

El efecto benéfico de los CBAD también se ha observado en especies dulceacuícolas. En la tilapia del Nilo *Oreochromis niloticus* a quien se le aplicó un extracto etanólico y se observó una mayor supervivencia, crecimiento y aumento de masa muscular (Junior *et al.*, 2017). En el pez Pacu (W+ HP y D+SU) *Piaractus mesopotamicus* se redujo la mortalidad durante el transporte de los organismos (De Oliveira *et al.*, 2013). En peces “guppy” *Poecilia reticulata* se observó (*Natrum muriaticum*) una reducción en el tiempo de desove (Sudha y Gokula, 2014). Esto demuestra el potencial uso y aplicación de CBAD para optimizar la producción de organismos marinos de importancia comercial para la acuicultura mexicana, como *C. virginica*.

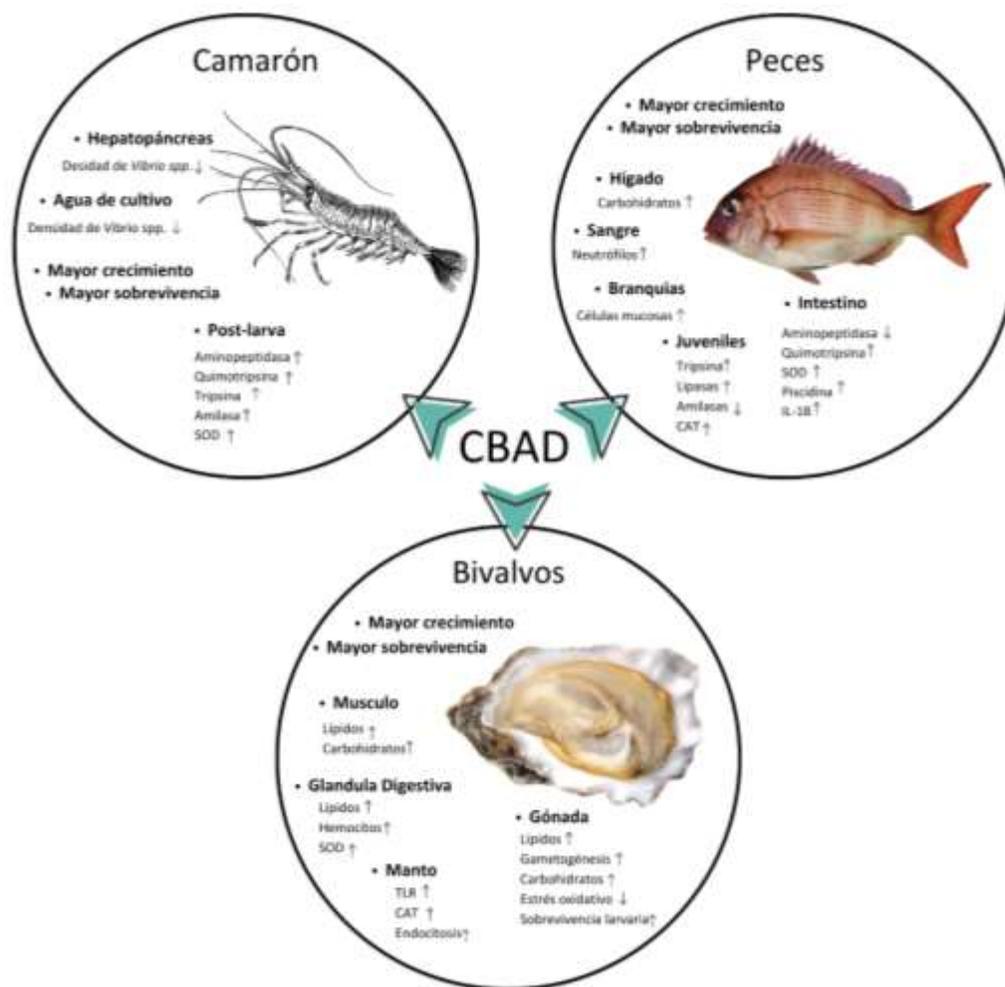


Figura 14.- Efecto de CBAD sobre diferentes biomarcadores regulados y evaluados en diversos tejidos de organismos marinos tratados profilácticamente con CBAD. Fuente: Tomado y modificado de López-Carvalho *et al.* (2021).

Tabla 3.- Efectos de la aplicación de CBAD en diferentes grupos de organismos marinos de importancia acuícola o pesquera.

ACTIN / CBAD	Objetivo de su aplicación profiláctica	Especie tratada	Efectos de su aplicación	Referencias
Actinomiceto probiótico; cepa RL8 de <i>Streptomyces sp.</i>	Acción probiótica, propiedades antifúngicas y antimicrobianas. Aumentar la absorción de macro y micronutrientes. Mejorar la calidad de agua de cultivo.	<i>P. vannamei</i>	Mejoras en la condición general de los organismos y la calidad del agua de cultivo.	García-Bernal <i>et al.</i> , 2016; 2019; 2020 ^a .
		<i>C. virginica</i>	Mejoras en la condición general de los organismos y absorción de macro y micronutrientes.	
		<i>C. sikamea</i>	Mejoras en la condición general de los organismos.	
		<i>C. corteziensis</i>	Mejoras en la condición general de los organismos.	
CBAD uso humano <i>Phosphoricum acid Similia</i>® (PhA)	Fortalecimiento del sistema inmune, digestivo, nervioso. Incrementar vigor y reducir el agotamiento.	<i>S. rivoliana</i>	Aumento de la tasa de crecimiento, lipasas, tripsinas, amilasas.	Mazón-Suástegui <i>et al.</i> , 2019 ^a ; 2019 ^b ; 2020 a; López-Carvallo <i>et al.</i> , 2019; 2020; García-Bernal <i>et al.</i> , 2020.
		<i>L. guttatus</i>	Aumento de la tasa de crecimiento, neutrófilos, células mucosas en branquias, factor de condición y supervivencia.	
		<i>P. vannamei</i>	Aumento de la supervivencia, aminopeptidasa, amilasa, quimotripsina y tripsina.	
		<i>A. ventricosus</i>	Aumento de catalasas, superóxido dismutasa, regulación de la endocitosis y mayores reservas energeticas.	
CBAD de uso humano <i>Silicea terra Similia</i>® (SiT)	Inmunomodulación. Mejorar la salud y condición fisiológica general	<i>C. virginica</i>	Maduración gonadal y mayores reservas energeticas.	
		<i>C. sikamea</i>	Maduración gonadal y mayor supervivencia larvaria.	
		<i>O. bimaculoides</i>	Mayor asimilación de alimentos.	
CBAD de uso acuícola formulado en CIBNOR a partir de lisado de <i>V. parahaemolyticus</i> (ViP) y a partir de lisado de <i>V. alginolyticus</i> (ViA)	Fortalecimiento del sistema inmune y digestivo. Incrementar la supervivencia.	<i>S. rivoliana</i>	Aumento de catalasas, superóxido dismutasa, quimotripsina, aminopeptidasa n.	Mazón-Suástegui <i>et al.</i> , 2016 a; 2019 a; 2019 b; 2020 a; 2021; Ibarra-García, 2018; López-Carvallo <i>et al.</i> , 2019; Rosero-García <i>et al.</i> , 2019.
		<i>P. vannamei</i>	Aumento de la tasa de crecimiento, supervivencia, lipasas, tripsinas.	
		<i>A. ventricosus</i>	Aumento de catalasas, superóxido dismutasa, mayor conteo de hemocitos.	
		<i>M. capax</i>	Aumento de la tasa de crecimiento.	
		<i>C. virginica</i>	Inducir la maduración gonadal.	

2.8 Efecto de actinomicetos probióticos marinos en organismos de cultivo acuícola

Los probióticos son microorganismos vivos que administrados en concentraciones adecuadas generan efectos benéficos para la salud de los organismos (Kim y Austin, 2006). El uso de probióticos en la industria acuícola es importante debido a su capacidad de control biológico de patógenos y su efecto benéfico en la salud de los organismos de cultivo (Tovar-Ramírez *et al.*, 2008; Sorroza *et al.*, 2009; Pérez-Chabela *et al.*, 2020), sin embargo, los microorganismos usados como probióticos pertenecen casi exclusivamente a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Burkholderia* (Campa-Córdova *et al.*, 2011; Villaseñor *et al.*, 2013). No obstante, algunas especies del género *Streptomyces sp.* incluye especies de bacterias ampliamente distribuidas en diferentes ambientes como suelos, sedimentos y cuerpos de agua, pueden producir compuestos bioactivos con propiedades antimicrobianas y antifúngicas, que pueden reducir la carga bacteriana y fúngica en los sistemas acuícolas (Ringo *et al.*, 2016). Estos compuestos también pueden mejorar la respuesta inmune en los organismos acuáticos y reducir mediante antagonismo y exclusión la carga de patógenos y, en consecuencia, prevenir infecciones. Investigaciones recientes han demostrado que algunas especies de este género tienen potencial como probióticos en la acuicultura (García-Bernal *et al.*, 2015; Faisal y Kim, 2018).

En la ostricultura, el uso de probióticos del género *Streptomyces sp.* se ha convertido en una estrategia prometedora para mejorar la condición general y aumentar el crecimiento de los organismos cultivados (García-Bernal *et al.*, 2015). Ringo *et al.* (2016) evaluaron el efecto de una cepa probiótica de *Streptomyces sp.* en la supervivencia y crecimiento de *C. gigas*. El efecto de una cepa probiótica del género *Streptomyces sp.* en la salud de *C. virginica* fue evaluada por Zhu *et al.* (2019) con resultados positivos. Se ha reportado que la aplicación de actinomicetos probióticos mejora sustancialmente la supervivencia y el desarrollo de las ostras, lo que sugiere que estos microorganismos tienen un gran potencial probiótico en la ostricultura de *C. virginica*. Igualmente, se ha documentado ampliamente que la aplicación de la cepa probiótica RL8 de *Streptomyces sp.* (ACTIN) mejora las condiciones fisiológicas de los organismos tratados, la calidad del agua y la absorción de macro y micronutrientes, contribuyendo de manera significativa a la maduración gonadal de ostreidos como: *C. sikamea* (García-Bernal *et al.*, 2017), y *C. corteziensis* (García-Bernal *et al.*, 2018) durante su acondicionamiento gonádico en

laboratorio. Igualmente se han reportado los efectos benéficos (aumento de la calidad de agua del cultivo y reducción de bacterias marinas perjudiciales) de la cepa RL8 (ACTIN) en el camarón blanco *P. vannamei* (García-Bernal *et al.*, 2020). A pesar de ello los actinomicetos marinos han sido pasados por alto como agentes probióticos en la industria acuícola (Dharmaraj y Kandasamy, 2010; Das *et al.*, 2010; Dharmaraj, 2010; Toung *et al.*, 2011), pero es indudable su potencial aplicabilidad en ostreidos.

2.9 Tecnologías moleculares para estudiar los efectos y mecanismos de acción de los CBAD

Existen una gran diversidad de técnicas que permiten evaluar la expresión de genes siendo las más usadas la reacción en cadena de la polimerasa conocida comúnmente como PCR y la hibridación *in situ* (Vinueza, 2009). La PCR desarrollada por Kary Mullis en la década de los 80s (Cornejo *et al.*, 2014) es en biología molecular la técnica más usada a nivel mundial y recientemente se ha expandido el uso de la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), la cual permite la cuantificación de la expresión de genes (Vinueza, 2009). La PCR en tiempo real posee alta especificidad y sensibilidad para la detección de la abundancia de secuencias objetivo (de 1 a 10^7 copias de un gen) (Brechtbuehl *et al.*, 2001; Cornejo *et al.*, 2014).

La qPCR, ha sido ampliamente usada en moluscos para evaluar los efectos en la expresión génica asociada a la presencia de contaminantes (Fiorito *et al.*, 2021), micro-compuestos (Medeiros *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2018; Tian *et al.*, 2021), infecciones bacterianas (Kett *et al.*, 2022), CBAD (López-Carvallo *et al.*, 2020); así como en la evaluación de efectos del shock térmico (Rahman *et al.*, 2023), por su alta sensibilidad y especificidad para la detección de marcadores específicos de la respuesta fisiológica de los organismos.

3. JUSTIFICACIÓN

La presente investigación se realizó con el fin de contribuir a mejorar varios aspectos de la ostricultura de *C. virginica* en la región del Golfo de México, incluyendo los siguientes puntos:

1.- Biología reproductiva: ampliar el conocimiento sobre los procesos de maduración sexual, actualizando el conocimiento sobre la gametogénesis.

2.- Acuicultura y seguridad alimentaria: contribuir a mejorar el rendimiento y calidad gonádica, acumulación de reservas energéticas y respuesta inmune en organismos adultos usados como stock reproductivo en un laboratorio ostrícola comercial como el Centro Ostrícola Tecnológico de Tabasco (COTET), mediante la utilización de CBAD y actinomicetos probióticos (ACTIN).

3.- Gestión sostenible de los recursos marinos: ofrecer alternativas para mejorar la producción sustentable de los laboratorios ostrícolas.

4.- Conciencia ambiental y educación: fomentar una mayor apreciación por la adopción de prácticas sustentables y eco-amigables en la acuicultura.

4. HIPÓTESIS

La aplicación profiláctica de compuestos bioactivos altamente diluidos (CBAD) y de actinomicetos con acción probiótica (ACTIN), en adultos reproductores de ostión americano *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791), tendrá una respuesta cuantificable a nivel de expresión génica asociada a procesos fisiológicos relacionados con la reproducción, el metabolismo y la respuesta inmune, con beneficios potenciales esperados en materia de producción de semillas de la especie.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar a nivel histológico y de expresión génica, el efecto de tratamientos formulados a partir de Compuestos Bioactivos Altamente Diluidos (CBAD) y Actinomicetos Probióticos (ACTIN), en la maduración gonádica del ostión americano *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791), utilizados como stock reproductivo en un laboratorio ostrícola comercial.

5.2 Objetivos particulares

-Analizar el efecto individual y sinérgico de CBAD y ACTIN en la maduración gonádica del ostión americano *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) utilizados como stock reproductivo en un laboratorio ostrícola comercial, mediante el análisis histológico de la glándula digestiva y gónada.

-Evaluar el efecto individual y sinérgico de CBAD y ACTIN en la maduración gonádica del ostión americano *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) utilizados como stock reproductivo en un laboratorio ostrícola comercial, en la expresión de genes asociados a la reproducción y a la respuesta inmune mediante qPCR.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Organismos experimentales y condiciones de cultivo.

El bioensayo experimental se llevó a cabo con ejemplares adultos de *C. virginica* en la sala de acondicionamiento gonádico de reproductores del laboratorio ostrícola de la empresa Productora de Especies Acuáticas S.A. de C.V. (PEASA), en el Centro Ostrícola Tecnológico del Estado de Tabasco (COTET, México) (Fig. 15), vía convenio con el laboratorio Experimental de Homeopatía Acuícola y Semillas Marinas del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR-MX).

Los reproductores previamente aclimatados y seleccionados por talla fueron colocados al azar en unidades de maduración las cuales consistieron en taras con capacidad de 40 litros que operan con flujo continuo de agua y alimento a temperatura de 23-24°C. Los reproductores se alimentaron con una mezcla celular 1:1 de las microalgas *Tisochrysis lutea* y *Chaetoceros calcitrans* manteniendo una concentración de 75×10^3 cel mL⁻¹, mediante su adición continua para compensar el consumo por filtración. Para el cálculo de disponibilidad de células de microalgas por organismo, se siguió la metodología de López-Carvallo *et al.* (2020), calculándose a partir de la información sobre el peso seco promedio para un millón de células para *T. lutea* y *C. calcitrans*, siendo un total de 2,485,714,286 millones de células por organismo por día.



Figura 15.- Condiciones experimentales en el área de acondicionamiento gonádico de reproductores de *Crassostrea virginica* en el Centro Ostrícola Tecnológico de Tabasco (COTET).

6.2 Diseño experimental.

Para evaluar el efecto individual y sinérgico de los CBAD y ACTIN se llevó a cabo un diseño experimental completamente al azar con grupos experimentales independientes y se aplicaron cinco tratamientos experimentales CBAD y/o ACTIN (T1 a T5) y dos tratamientos control (T6 y T7) cada uno con 3 réplicas y 20 organismos por réplica.

El **tratamiento T1** se elaboró con la cepa RL8 del actinomiceto marino *Streptomyces sp.* (ACTIN).

El **tratamiento T2** se elaboró con partes iguales de lisados bacterianos inactivados, preparados en el CIBNOR en 6ª dilución centesimal (1:99) Hahnemania de *Vibrio parahaemolyticus* (ViP-6C) y de *Vibrio alginolyticus* (ViA-6C).

El **tratamiento T3** se preparó con partes iguales de los medicamentos homeopáticos en 6ª dilución centesimal (1:99) Hahnemania, *Phosphoricum acid* (PhA-6C) y *Silicea terra* (SiT-6C) de Laboratorio Similia® (CDMX, MX), con registro oficial para uso humano en la Secretaría de Salud

de México.

El **tratamiento T4** se formuló con partes iguales de ViP-6C + ViA-6C + la cepa RL8.

El **tratamiento T5** se formuló con partes iguales de PhA-6C+ SiT-6C + la cepa RL8.

El **tratamiento T6** fue considerado como Control positivo y se aplicó alcohol de uso homeopático.

El **tratamiento T7** fue considerado como Control negativo y se aplicó agua destilada.

El tratamiento **T1** se elaboró para evaluar el efecto individual de ACTIN; los tratamientos **T2** y **T3** se formularon para evaluar el efecto individual de CBAD; **T4** y **T5** se formularon para evaluar el efecto sinérgico de CBAD y ACTIN, y **T6** y **T7** aplicaron como tratamientos de referencia.

Para todos los tratamientos basados en CBAD se utilizaron como vehículo de aplicación, glóbulos comprimidos de lactosa estériles e impregnados hasta saturación con el respectivo tratamiento. Los glóbulos se secaron a temperatura ambiente (24 h, 25°C) hasta la evaporación del alcohol con el fin de prevenir sus posibles efectos secundarios en los organismos. Una vez evaporado el alcohol se protegieron del polvo y contaminantes ambientales y se conservaron en oscuridad en botellas de vidrio ámbar (Mazón-Suástegui *et al.*, 2019a).

La aplicación de los CBAD fue a razón de un glóbulo por organismo por día; la aplicación de los actinomicetos probióticos de la cepa RL8 (ACTIN) fue de 1.33 g de biomasa por réplica calculada a partir de un cultivo bacteriano a densidad óptica específica (DO=1) (García-Bernal *et al.*, 2020).

En total se realizaron dos muestreos, uno inicial antes de aplicar los tratamientos (0 días) y uno final al término del experimento (45 días). Durante cada muestreo se seleccionaron al azar los siguientes números de 10 organismos por réplica de cada tratamiento (Total= 30 organismos por tratamiento), se disecó tejido de glándula digestiva y gónada y se preservó en solución Davidson para su posterior análisis histológico e histoquímico.

Para los análisis de expresión génica se tomaron 3 organismos por réplica experimental, más un organismo adicional elegido al azar (Total= 10 organismos por tratamiento), se disecó tejido de

glándula digestiva, gónada, manto y branquia, y se fijó en solución de RNAlater (RNAlater Stabilization solution #AM7020, ThermoFisher, Scientific, MA, USA).

Tabla 4.- Diseño experimental para evaluar el efecto individual y sinérgico de CBAD y ACTIN en reproductores de ostión americano *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) acondicionados para su maduración sexual en condiciones controladas de laboratorio. N: número de organismos; NT: número total de organismos por tratamiento.

Tratamiento	Réplica #1	Réplica #2	Réplica #3	
<i>Streptomyces sp:</i> Cepa probiótica RL8	N=20	N=20	N=20	NT=60
ViP 6C + ViA 6C	N=20	N=20	N=20	NT=60
PhA 6C+ SiT 6C	N=20	N=20	N=20	NT=60
ViP 6C +ViA 6C + RL8	N=20	N=20	N=20	NT=60
PhA 6C+ SiT 6C + RL8	N=20	N=20	N=20	NT=60
Control (+) Alcohol 87° GL Similia®	N=20	N=20	N=20	NT=60
Control (-) Agua destilada	N=20	N=20	N=20	NT=60

6.3 Análisis histológico

Las muestras fijadas en solución Davidson, fueron sometidas a un proceso de deshidratación utilizando una serie de alcoholes en concentraciones ascendentes (70 al 100%); después se aclararon con xileno y se incluyeron en parafina, formando bloques. Cada bloque fue colocado en un micrótopo de rotación (Leica RM 2125, Leica Microsystems, USA) para realizar cortes con un grosor de 4 μm . Cada corte de tejido gonádico se extendió en un baño de flotación con agua destilada a 40°C y fue colocado en portaobjetos de vidrio para ser teñido con Hematoxilina-Eosina (Humanson, 1972) mediante un multi-teñidor automático (Leica ST5020). Las laminillas montadas se observaron en un microscopio óptico (Olympus BX-50, Olympus Optical, Japan) y de cada corte histológico se capturaron tres imágenes digitales a diferentes aumentos (20X, 40X y 100X), por medio de una cámara digital (CoolSNAP-Pro) instalada al microscopio.

Cada imagen fue analizada para realizar la caracterización y asignación de estadios de desarrollo gonádico, utilizando como base la descripción de Rodríguez-Jaramillo *et al.* (2008) y Rodríguez-Jaramillo *et al.* (2022) para *C. gigas* y *C. corteziensis*, y de Zamora *et al.* (2003) para *C. virginica*. El procesamiento histológico de las muestras se realizó en el Laboratorio de Histología e histoquímica del CIBNOR, aplicando las metodologías de Rodríguez-Jaramillo *et al.* (2008).

6.4 Indicadores de condición gonádica

6.4.1 Frecuencia de ovocitos por tratamiento

La frecuencia de ovocitos por estadio se obtuvo de acuerdo con la metodología propuesta por Rodríguez-Jaramillo *et al.* (2008) en la cual se identifica a cada tipo de ovocito por sus características. La frecuencia de ovocitos en cada hembra perteneciente a cada uno de los tratamientos fue calculada mediante el conteo de los diferentes tipos de ovocitos (oogonias, previtelogénicos, vitelogénicos, postvitelogénicos y atrésicos) en tres regiones de la gónada que fue posible visualizar en un área de 1.44 mm² a 20X.

6.4.2 Diámetro teórico de ovocitos (DT)

El diámetro Teórico (DT) se obtuvo cuantificando el área de ovocitos postvitelogénicos con núcleo definido (N= 30, exceptuando ovocitos atrésicos y/o en degeneración). Para cada

hembra, se utilizaron tres microfotografías de diferentes regiones de la gónada digitalizadas a 40X. Para obtener el DT de los ovocitos se utilizó la fórmula descrita por Saout *et al.* (1999):

$$DT = \sqrt{4AO / \pi} \quad (1)$$

DT= Diámetro teórico

AO= Área de ovocito

6.4.3 Relación núcleo/citoplasma de ovocitos (N/C)

Utilizando los valores obtenidos del área del núcleo y del citoplasma de 30 ovocitos postvitelogénicos con núcleo bien definido de cada hembra, se calculó la relación núcleo/citoplasma de ovocitos, conforme a Rodríguez-Jaramillo *et al.* (2008) utilizando la siguiente fórmula:

$$N/C = \text{área del nucleoplasma} / \text{área del ovoplasma} \quad (2)$$

6.4.4 Cuantificación histoquímica de triglicéridos y fosfolípidos

El contenido de triglicéridos y fosfolípidos en la gónada de hembras se cuantificó mediante la metodología descrita por Rodríguez-Jaramillo *et al.* (2004), utilizando la tinción de Sudan negro. Esta técnica permite teñir esteres de colesterol y triglicéridos (TGS) en tonalidades que van del azul oscuro a negro y fosfolípidos (FLPs) los cuales adquieren una tonalidad gris (Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2008). Para la cuantificación se obtuvieron tres imágenes digitales con el objetivo de 40X de cada gónada teñida con Sudan negro y utilizando el programa Image ProPlus versión 4.5 se determinó el área de cobertura de los pixeles de un tono específico (grises que corresponden a los FLPs y/o azul oscuro a negro correspondiente a TGS). Adicionalmente se determinó el área de 30 ovocitos postvitelogenicos y se obtuvieron los índices de FLPs y de TGS, para cada ovocito evaluado, aplicando las ecuaciones propuestas por Rodríguez-Jaramillo (2004), calculando el área de cobertura (μm^2) que ocupan los pixeles de un tono específico dentro del ovocito (grises que corresponden a los FLPs y/o azul oscuro a negro correspondiente a TGS), entre el área del ovocito:

$$\text{FLPs} = (\text{FLPs área de cobertura} / \text{área del ovocito}) * 100$$

y

$$\text{TGS} = (\text{TGS área de cobertura} / \text{área del ovocito}) * 100 \quad (4)$$

6.5 Indicadores de condición fisiológica general

6.5.1 Índice de la glándula digestiva (IGD)

La condición fisiológica general de los reproductores previamente tratados con CBAD y ACTIN fue evaluada mediante el índice de glándula digestiva (IGD) propuesto por Mazón-Suástegui *et al.* (2009). Para determinar el IGD se tomaron sistemáticamente cinco microfotografías a 10X de cada organismo caracterizado como hembra o macho, utilizando el programa Image Pro-Plus versión 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA), y se calculó el área de cobertura ocupada por los adenómeros y el área de cobertura de la glándula digestiva, aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{IGD \%} = (\text{ACA}(\mu\text{m}^2) / \text{ACT}(\mu\text{m}^2)) * 100 \quad (5)$$

ACA = Área de Cobertura ocupada por los Adenómeros

ACT = Área de Cobertura Total de la glándula digestiva.

6.5.2 Altura de los túbulos digestivos

La altura de los túbulos digestivos también se usó para evaluar la condición fisiológica general de los reproductores para calcularla se consideraron tres microfotografías tomadas a 20X de la glándula digestiva de cada organismo y se analizaron mediante el software Image Pro Plus versión 6.0 (Media Cybernetics, Bethesda, MD).

6.6 Indicador de respuesta inmune.

6.6.1 Conteo de hemocitos

La cuantificación de hemocitos se realizó siguiendo la metodología descrita por Bianchi *et al.* (2015), consistiendo en la digitalización de tres microfotografías a 100X de tejido de glándula

digestiva teñido con hematoxilina-eosina y se realizó el conteo de hemocitos en un área delimitada (0.21mm^2) mediante el software Image Pro-Plus versión 6.0 (Media Cybernetics, Bethesda, MD).

6.7 Expresión relativa de genes

6.7.1 Extracción de ARN total

Para realizar la extracción de ARN total de branquia, glándula digestiva, gónada y manto de cada organismo, se tomó aproximadamente 50 mg de tejido de cada muestra obtenida de los organismos, se lavó en H_2O libre de nucleasas para eliminar el exceso de RNAlater y se colocó en un tubo eppendorf de 1.6 ml que contenía 800 μl Trizol (Invitrogen, Thermo Fisher, Scientific, MA, USA) y 100 mg de perlas de cristal (Glass Beads Acid-Washed, Sigma). Todos los tubos eppendorf con las muestras de tejido y Trizol fueron colocadas sobre una cama de hielo. Para lisar el tejido de cada muestra se utilizó el homogenizador mecánico de alta velocidad FastPrep-24 (MP Biomedicals, LLC, Santa Ana, CA, USA) durante 60 segundos a una velocidad de 6 m/s. Posteriormente las muestras se incubaron en hielo durante 5 minutos y se centrifugaron a 12,000 g por 10 minutos a 4°C . El sobrenadante de cada muestra fue transferido a un tubo eppendorf de 1.6 ml nuevo y se adicionó 300 μl de cloroformo. Las muestras fueron agitadas durante 10 segundos utilizando un vortex y fueron incubadas a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente, se llevó a cabo otra centrifugación a 12,000 g durante 15 minutos a 4°C . La fase acuosa, que contiene el ARN, fue transferida a un tubo eppendorf de 1.6 ml nuevo, se adicionaron 500 μl de etanol absoluto y se mezcló lentamente mediante inversión por lo menos cinco veces para inducir la precipitación del ARN. Los tubos se colocaron toda la noche a -20°C para favorecer una mayor precipitación. Al día siguiente, se realizó una centrifugación a 12,000 g durante 15 minutos a 4°C y posteriormente, se removió cuidadosamente el etanol y se procedió a un lavado del pellet de ARN con 500 μl de etanol al 70% (preparado con H_2O libre de nucleasas). Esta etapa de lavado se llevó a cabo mediante una incubación en hielo durante 10 minutos. Después de esta incubación, las muestras se centrifugaron a 12,000 g durante 10 minutos a 4°C , descartando el sobrenadante. Se procedió a la eliminación del etanol residual mediante una centrifugación de 1 minuto con las mismas condiciones. El pellet de ARN obtenido se dejó secar en una campana de extracción durante aproximadamente 20 minutos. Finalmente,

el ARN se resuspendió en volúmenes de 20 μ l de H₂O libre de nucleasas. El ARN total obtenido se cuantificó en un espectrofluorómetro NanoDrop 2000/2000c™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) y su integridad se evaluó mediante electroforesis.

La eliminación del ADN genómico de cada muestra de ARN total se realizó mediante la aplicación de 5 U de DNase I (RQ1, Promega, Madison, WI, USA) en un volumen final de 20 μ l. La reacción de degradación del ADN genómico se llevó a cabo añadiendo 1X de Buffer, 0.5 U de RNAsin (Promega, Madison, WI, USA) y H₂O libre de nucleasas. El proceso de digestión se llevó a cabo mediante incubación a 37 °C durante 60 minutos. Posteriormente, se procedió a realizar la amplificación por PCR utilizando el gen de referencia *β -Actina*. Se tomaron 1 μ l de cada muestra tratada con DNase I para verificar la eliminación completa del ADN genómico. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de reacción de 6 μ l, que contenía 1 μ l de ARN tratado, 0.25 U de Go-Taq Flexi Polymerasa (Promega, Madison, WI, USA), 1X de Colorless GoTaqFlexi Buffer (Promega, Madison, WI, USA), 2.0 mM de MgCl₂ (Promega, Madison, WI, USA), 0.2 mM de dNTP mix (Promega, Madison, WI, USA) y H₂O libre de nucleasas. Las condiciones de amplificación consistieron en una etapa inicial de desnaturalización a 94°C durante 4 minutos, seguida de 35 ciclos y fijando la condición de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, alineación a 60°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 30 segundos. Finalmente, se realizó una extensión final a 72°C durante 10 minutos. La ausencia de amplificación de productos se verificó mediante electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X. La electroforesis se llevó a cabo durante 40 minutos a 100 voltios, utilizando un marcador de 100 pb (DNA Ladder, Promega, Madison, WI, USA) y la tinción fluorescente con GelRed (Biotium Inc, Fredmont, CA, USA).

6.7.2 Síntesis de ADN complementario (ADNc)

Una vez verificada la degradación del ADN genómico, se realizó una precipitación del ARN siguiendo el protocolo descrito por Sambrook (2001). Para ello, se añadió 0.5 volúmenes de LiCl 8M y 300 μ l de etanol absoluto al ARN, que posteriormente fue centrifugado a 12,000 g durante 10 minutos a 4°C. Luego de la centrifugación, se llevó a cabo una decantación y se procedió a lavar el pellet con 500 μ l de etanol al 75%. Se repitió el proceso de centrifugación y decantación,

y finalmente el pellet se secó en una campana de flujo laminar durante aproximadamente 20 minutos. El ARN obtenido se resuspendió en 20 μ l de agua libre de nucleasas. La concentración de ARN obtenido de cada muestra se determinó utilizando un espectrofluorómetro NanoDrop 2000/2000c™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), y se evaluó la integridad mediante electroforesis horizontal de 1 μ g de ARN extraído de cada tejido (gónada, branquia, glándula digestiva y manto) en un gel de agarosa al 1% con buffer TBE 1X, utilizando una corriente de 60 voltios durante 60 minutos. Una vez confirmada la integridad de las muestras, se utilizó 1 μ g de ARN total para la síntesis del ADN complementario (ADNc), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante del sistema de transcripción inversa Improm II (Promega), utilizando una mezcla de Oligo (dT)₁₅/Random Primers. Para verificar la adecuada síntesis del ADNc, se realizó una amplificación por PCR utilizando el gen de *β -Actina*. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de reacción de 6 μ l, conteniendo 0.5 μ l de ADNc, 0.25 U de Go-Taq Flexi Polymerasa (Promega, Madison, WI, USA), 1X de Colorless GoTaqFlexi Buffer (Promega, Madison, WI, USA), 2.0 mM de MgCl₂ (Promega, Madison, WI, USA), 0.2 mM de dNTP mix (Promega, Madison, WI, USA) y agua libre de nucleasas. Las condiciones de amplificación consistieron en una etapa inicial de desnaturalización de 4 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, alineación a 60°C durante 30 segundos, y extensión a 72°C durante 30 segundos. Finalmente, se realizó una extensión final de 10 minutos a 72°C. Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1% con buffer TBE 1X, utilizando una corriente de 100 voltios durante 40 minutos. Utilizando un marcador de 100 pb (DNA Ladder, Promega, Madison, WI, USA). La visualización se realizó mediante tinción fluorescente con GelRed (Biotium Inc, Fredmont, CA,

6.7.3 Cuantificación de expresión génica (qPCR)

La eficiencia de amplificación de los primers utilizados para cada gen de interés (Tabla 5), se realizó utilizando seis diluciones seriadas (factor de dilución 1:50). Estas diluciones se llevaron a cabo utilizando un pool de 84 muestras de ADNc. Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 15 μ l y se utilizó un mix para qPCR preparado en el laboratorio. La mezcla de reacción consistió en: 7.5 μ l de una solución que contenía 1X EvaGreen (Biotium Inc, Fredmont, CA, USA), 0.45 U de Go-Taq Flexi Polymerase (Promega, Madison, WI, USA), 1X

Colorless Go-Taq Flexi Buffer (Promega, Madison, WI, USA), 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTP mix (Promega, Madison, WI, USA) y agua de grado biología molecular (Sigma Aldrich, San Luis, MI, USA). Además, se agregaron 5 µl de la dilución (1:50) de ADNc y oligonucleótidos específicos para cada gen (Glutathión S-transferasa (GSTO), Lectina tipo C (qCvML), AF2 y Vitelogenina (VTG) [0.15 µM]; *β-Actina* [0.20 µM], Factor de Elongación (EF) [0.48 µM] y 28S Ribosomal [0.40 µM]). Las condiciones de amplificación fueron: una etapa inicial de desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificación que incluyeron 15 segundos a 95°C, 15 segundos a 60°C y 15 segundos a 72°C, donde se realizó la lectura de la fluorescencia (denaturalización/alineación/extensión). La curva de desnaturalización se generó mediante un aumento de temperatura desde 60°C hasta 95°C, con un incremento de 0.5°C por cada 5 segundos. Las amplificaciones se llevaron a cabo por triplicado utilizando un termociclador de tiempo real CFX96 (Bio-Rad, CA, USA), placas de 96 pozos y films adhesivos ópticos (Bio-Rad, CA, USA).

Los valores de eficiencia se obtuvieron a partir de la pendiente del logaritmo del factor de dilución frente a la fluorescencia, utilizando la ecuación $E = (10)^{-1/\text{slope}} - 1$ (Bustin et al., 2009). Una vez determinada la eficiencia y la concentración adecuada de oligonucleótidos para cada gen, se realizaron las amplificaciones en cada una de las muestras. Se utilizaron 3 réplicas de cada muestra y los datos obtenidos (Cq) de cada réplica se promediaron y se utilizaron para calcular la estabilidad de la expresión de los genes de referencia mediante el uso del programa RefFinder (Xie *et al.*, 2012), el cual se basa en los algoritmos utilizados por los programas geNorm, NormFinder, BestKeeper y el método de Cq Comparativo. Los valores de expresión relativa (ER) de los genes objetivo se calcularon utilizando la fórmula $ER = CR_{gb} / CR_{fn}$ (donde gb representa al gen objetivo y fn al factor de normalización, que es la media geométrica de los genes de referencia). Las cantidades relativas (CR) de los genes de referencia más estables y los genes objetivo, fueron estimadas con la fórmula.

$$CR = (1+E)^{(Cq \text{ promedio} - Cq)} \quad (6)$$

Tabla 5.- Secuencias de los *primers* utilizados en el análisis de expresión diferencial de genes asociados con el proceso reproductivo y respuesta inmune de *Crassostrea virginica*, y de genes de referencia.

Gen	Nombre del primer	Secuencia 5'-3'	Nº bases	Tam año	Eficiencia %
Lectina tipo C	qCvML-F	TGTCTGTCTGTCTGTCTGACTGTG	25	140	105.1
	qCvML-R	AACGGTTACCAGGTAGCTCCTCATC	25		
Glutation S-transferasa	GSTO_Cvirg119-F	TGGATTGAACAATTTCTTATGTT	23	119	92.2
	GSTO_Cvirg119-R	ACGACGGCGGGACTCTTTGACA	22		
Vitelogenina	Vtg-F	CAGCATCGTTCTCCTTCCA	19	173	111.9
	Vtg-R	GGTGTCTGGGACTGTTGA	19		
AF2 (Activation Funtions 2)	AF2-F	CCTCTCTACAATGGCGTCCC	20	330	94.8
	AF-R	CGTAGAGTCCAGACGGATGC	21		
28S Ribosomal	28S-F	GATGCTGGAAGTGTGGT	18	169	92
	28S-R	CTTTGGGCTGCATTCTCAA	19		
Factor de elongación	EF-F	GATTGCCACACTGCTCACAT	20	114	97.3
	EF-R	AGCATCTCCGTTCTTGATGC	20		
β -Actina	β -actin-F	GTCAAGAGGACGGGGTGT	19	145	98.7
	β -actin-R	CCCAGAGCAAGAGAGGTATCC	21		

6.8 Análisis estadísticos

La normalidad de todos los datos se evaluó mediante la Prueba de Kolmogorov-Smirnoff (Lilliefors, 1967; Zar, 2013) y la homogeneidad de varianza mediante la Prueba de Levene (Levene, 1960; Zar, 2013). Los datos que no presentaron una distribución normal y los valores Ct's utilizados en expresión génica se transformaron a \log_{10} y los datos en porcentaje se transformaron a arcoseno.

Para determinar diferencias entre los tratamientos se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) considerando como factor los tratamientos y como variables de respuesta los valores obtenidos de expresión relativa de cada gen, índice de la glándula digestiva, contenido de fosfolípidos y triglicéridos, diámetro teórico de ovocitos, relación núcleo/citoplasma de ovocitos (N/C), altura de los túbulos digestivos y número de hemocitos.

En los casos en que se obtuvieron diferencias significativas se realizó el análisis de comparación

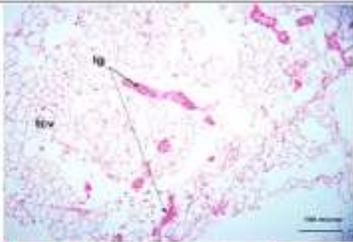
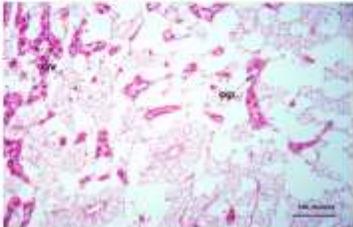
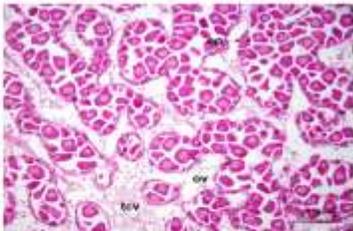
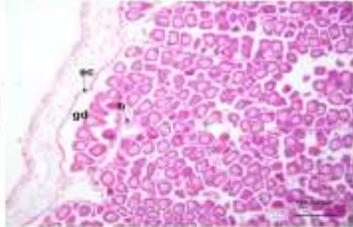
de medias de Tukey. Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el software IBM-SPSS 26. El nivel de significancia fue de $\alpha < 0,05$. Todos los datos fueron re-transformados a su escala original para presentarse en tablas y/o gráficas. Todos los resultados se presentan como media \pm error estándar (SE).

7. RESULTADOS

7.1 Estadios de desarrollo gonádico

En hembras, se caracterizaron 6 estadios de desarrollo gonádico: estadio 0 o indiferenciado, estadio I o Previtelogénesis también conocido como Gametogénesis inicial, estadio II o Vitelogénesis también conocido como Gametogénesis avanzada, estadio III o Postvitelogénesis también conocido como Madurez, estadio IV o Desove parcial y estadio V o Post-desove (Tabla 6; Fig. 16). De igual manera para machos, se caracterizaron 6 estadios de desarrollo gonádico: estadio 0 o Indiferenciado, estadio I o Espermatogénesis inicial, estadio II o Espermatogénesis avanzada, estadio III o Madurez, estadio IV o Desove parcial y estadio V o Post-desove.

Tabla 6.- Microfotografías de los estadios de desarrollo gonádico identificados en hembras de *Crassostrea virginica* tratadas con Compuestos Bioactivos Altamente Diluidos (CBAD) y Actinomicetos (ACTIN). Imágenes histológicas 20X (200X barra de escala=100 μ m).

		Descripción	Imagen histológica 200x
S0	Indiferenciado	No hay evidencia de presencia de folículos. El tejido conectivo inicia su desarrollo hasta la constitución de una capa gruesa. Presencia de la línea germinal. No es posible determinar el sexo.	
S1	Previtelogénesis o gametogénesis inicial	Se observa actividad gametogénica vesicular en el tejido conjuntivo, así como ovocitos inmaduros adheridos a la pared del folículo y pocos ovocitos maduros en el gonoducto. Tejido conectivo abundante.	
SII	Vitelogénesis o gametogénesis avanzada	Abundantes ovocitos dispuestos a la luz de los túbulos. Folículos grandes y anastomosados. Las paredes foliculares son delgadas. El posible diferencias oogonios, en los acinos, predominan los ovocitos grandes en forma de pera.	
SIII	Postvitelogénesis o madurez	Ovocitos vitelogénicos libres con núcleo diferenciado y nucleolo, con forma redonda o poligonales. Citoplasma abundante y granular. Tejido conectivo interfolicular reducido por el crecimiento de los folículos.	
SIV	Desove parcial	Los folículos se rompen y se liberan los ovocitos postvitelogénicos, dejando espacios en la gónada. Se puede observar un desove parcial.	
SV	Post-desove	Cese de la expulsión de los ovocitos. Se aprecian grandes espacios vacíos en la gónada con restos de ovocitos. Los folículos se rompen con la actividad fagocítica en sus paredes. Aumento del tejido conectivo vesicular.	

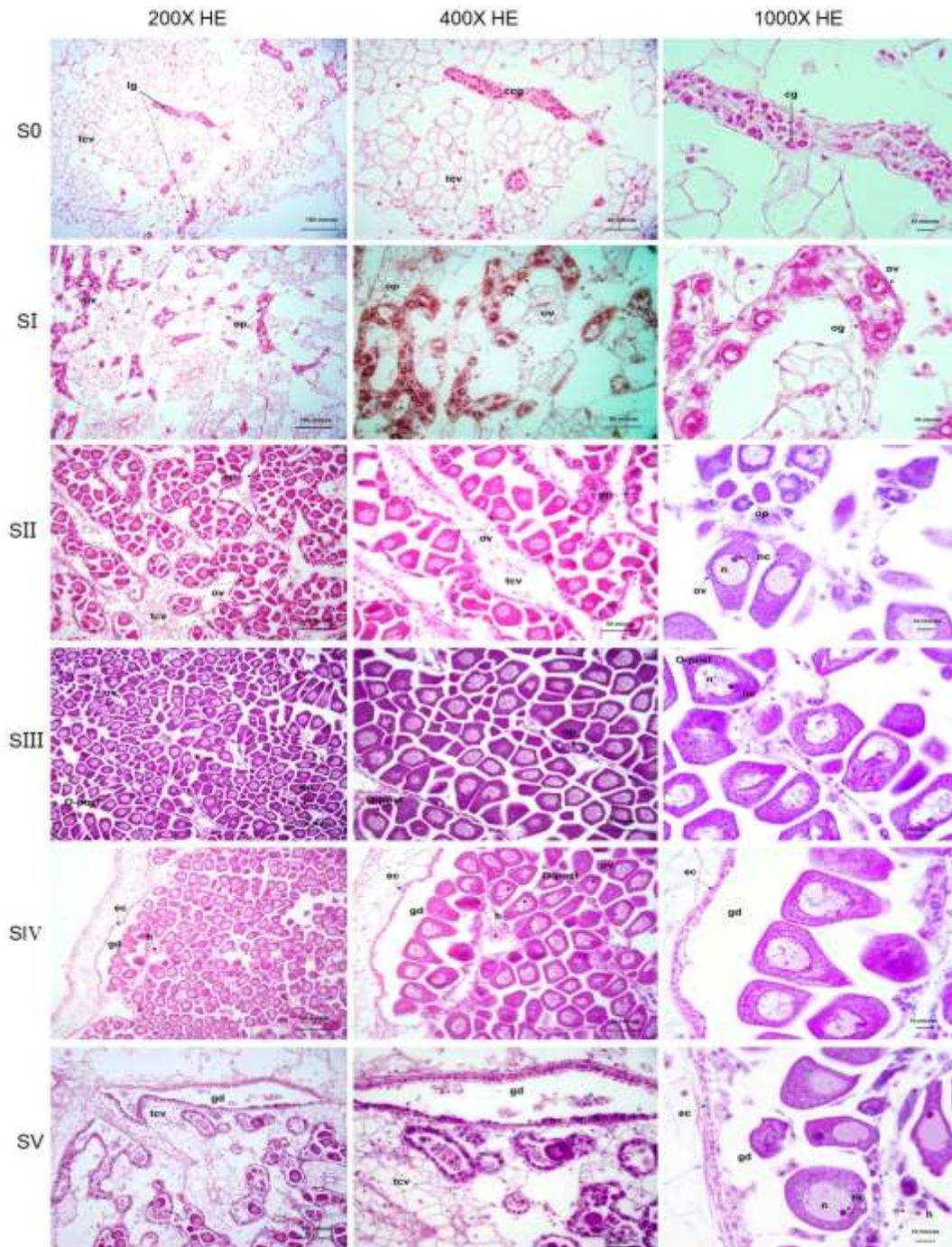


Figura 16.- Imágenes histológicas a 200X (tinción Hematoxilina-Eosina) de las diferentes etapas del desarrollo gonádico en hembras de *Crassostrea virginica*. **S0**= Indiferenciado, **SI**= Previtelogénesis o Gametogénesis inicial, **SII**= Vitelogénesis o Gametogénesis avanzada, **SIII**= Postvitelogénesis o Madurez, **SIV**= Desove parcial, **SV**= Post-desove. 200X barra de escala=100 μ m, 400X barra de escala= 50 μ m y 1000X barra de escala= 10 μ m. Abreviaciones: ccg= capa de células germinales, tcv= tejido conectivo vesicular, lg= línea germinal, cg= células germinales, op= ovocitos previtelogénicos, ov= ovocitos vitelogénicos, og= oogonia, n= núcleo, nc= nucléolo, O-post= ovocitos postvitelogénicos, ec= epitelio ciliado, gd= gonoductos, h= hemocitos.

En el caso de las hembras (Fig. 17) se identificaron 4 estadios de madurez al inicio del experimento (**M0**), un 35% fueron hembras en estadio II (Vitelogénesis), 35% en estadio III (Postvitelogénesis), 20% en estadio IV (Desove parcial) y el 10% en estadio 0 (Indiferenciado).

Al final del bioensayo experimental, en las hembras de los tratamientos **T1** y **T5** se identificaron los seis estadios de madurez caracterizados; en el tratamiento **T2** se identificaron cinco estadios, y solo cuatro en las hembras de los tratamientos **T3**, **T4**, **T6** y **T7**.

El 40% de las hembras del tratamiento **T1**, se encontraron en estadio IV (Desove parcial), 25% en estadio 0 (Indiferenciado), 10% en estadio I (Previtelogénesis), 10% en estadio II (Vitelogénesis), 5% en estadio III (Postvitelogénesis) y 10% en estadio V (Post-desove). Para **T2**, el 45% de las hembras tratadas se encontraron en estadio IV (Desove parcial), 12% en estadio 0 (Indiferenciado), 15% en estadio II (Vitelogénesis), 13% en estadio III (Postvitelogénesis) y 10% en estadio V (Post-desove). Con respecto a **T3**, el 30% de las hembras se encontraron en estadio 0 (Indiferenciado), 15% en estadio II (Vitelogénesis), 20% en estadio III (Postvitelogénesis) y 35% en estadio IV (Desove parcial). En el tratamiento **T4**, el 38% de las hembras se encontraron en estadio 0 (Indiferenciado), 10% en estadio II (Vitelogénesis), 22% en estadio III (Postvitelogénesis), y 30% en estadio IV o (Desove parcial). En el **T5**, el 37% de las hembras se encontraron en estadio 0 (Indiferenciado), 3% en estadio I (Previtelogénesis), 20% en estadio II (Vitelogénesis), 10% en estadio III (Postvitelogénesis), 20% en estadio IV (Desove parcial), y 10% en estadio V (Post-desove). Con respecto al tratamiento control positivo **T6**, el 38% de las hembras se encontraron en estadio 0 (Indiferenciado), 10% en estadio II (Vitelogénesis), 27% en estadio IV (Desove parcial) y 15% en estadio V (Post-desove). Finalmente, para el tratamiento control positivo **T7**, el 15 % de las hembras tratadas se encontraron en estadio 0 (Indiferenciado), 25% en estadio I (Previtelogénesis), 10% en estadio II (Vitelogénesis) y 50% en estadio III (Desove parcial).

Mediante un análisis comparativo entre los diferentes tratamientos, se encontró que el mayor porcentaje de hembras en estadio 0 (Indiferenciado) se presentó en el tratamiento **T4** con un 37%. El mayor porcentaje de hembras en estadio de I (Previtelogénesis) se identificó en el tratamiento **T7** con un 25%. El estadio II (Vitelogénesis) se identificó en mayor porcentaje en

hembras del tratamiento **T5** con un 19%. El estadio III (Postvitelogénesis) se presentó en mayor porcentaje en el tratamiento **T4** con un 22%. El mayor porcentaje de hembras en estadio IV (Desove parcial) se presentó en el tratamiento control negativo (**T7**) con un 50%, y el estadio V (Postdesove) se presentó en un mayor porcentaje en las hembras del tratamiento control alcohol de uso homeopático (**T6**) con un 18%.

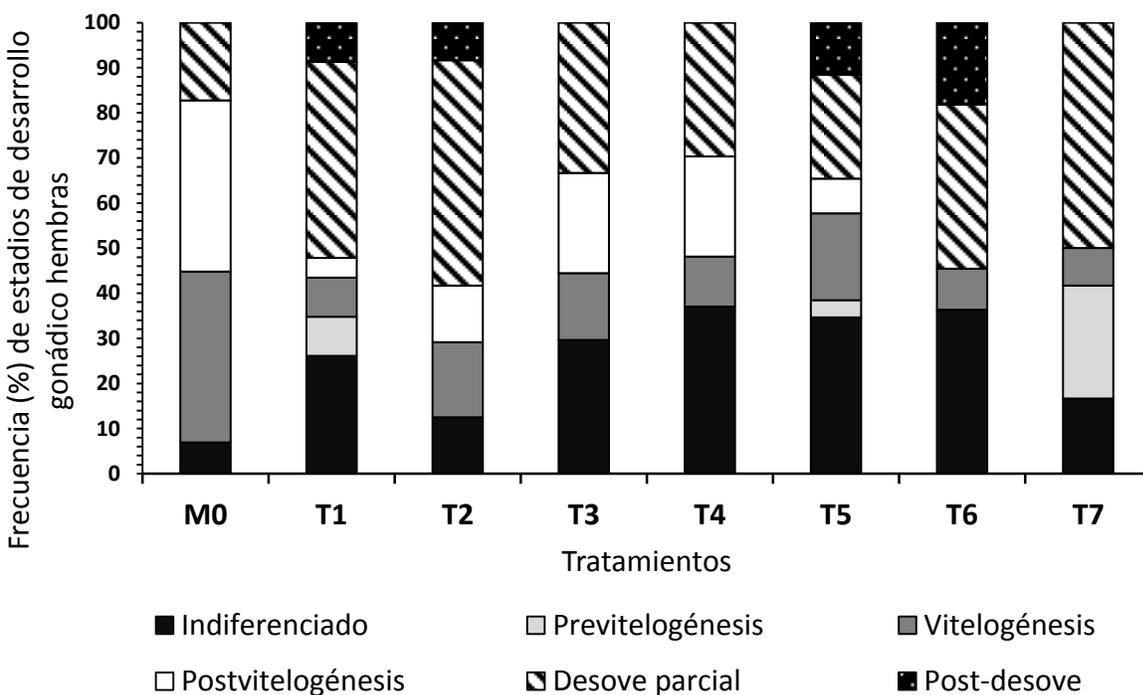


Figura 17.- Frecuencia (%) de estadios de desarrollo gonádico de hembras de *Crassostrea virginica* al inicio y final del bioensayo experimental. **M0**: Muestreo inicial, **T1**: RL8, **T2**: ViP 6C +ViA 6C, **T3**: PhA 6C+SiT 6C, **T4**: ViP 6C+ViA 6C+RL8, **T5**: PhA 6C+SiT 6C+RL8, **T6**: (Control positivo) alcohol de uso homeopático, **T7**: (Control negativo) agua destilada.

En el caso de los machos (Fig. 18) al inicio del experimento (**M0**) se identificaron 6 estadios de madurez caracterizados en este estudio. El 15% se encontraron en estadio 0 (Indiferenciado), 12% en estadio I (Espermatogénesis inicial), 13% en estadio II (Espermatogénesis avanzada), 10% en estadio III (Madurez), 35% en estadio IV (Desove parcial) y 15% en estadio V (Post-desove).

Al final del bioensayo experimental, en los machos de los tratamientos control (**T6** y **T7**) se identificaron cinco estadios de madurez caracterizados. En los tratamientos **T2** y **T5** se identificaron cuatro estadios. En los tratamientos **T1** y **T3** se identificaron tres estadios, y en el tratamiento **T4** se identificaron dos estadios. En el tratamiento **T1**, el 50% de los machos se encontraron en estadio 0 (Indiferenciado), 8% en estadio II (Espermatogénesis avanzada) y 42% en estadio IV (Desove parcial). En el **T2**, el 33% de los machos tratados se encontraron en estadio 0 (Indiferenciado), 33% en estadio II (Espermatogénesis avanzada), 12% en estadio III (Madurez) y 22% en estadio IV (Desove parcial). En el tratamiento **T3**, el 72% de los machos se encontraron en estadio 0 (Indiferenciado), 19% en estadio II (Espermatogénesis avanzada) y 9% en estadio IV (Desove parcial). En el tratamiento **T4**, el 77% de los machos se encontraron en estadio 0 (Indiferenciado) y 23% en estadio IV (Desove parcial). En el **T5**, el 69% de los machos se encontraron en estadio 0 (Indiferenciado), 8% en estadio I (Espermatogénesis inicial), 15% en estadio II (Espermatogénesis avanzada) y 8% en estadio V (Post-desove). En el tratamiento control positivo **T6**, el 50% de los machos del control negativo alcohol de uso homeopático se encontraron en estadio 0 (Indiferenciado), 12% en estadio II (Espermatogénesis avanzada), 19% en estadio III (Madurez) y 13% en estadio IV (Desove parcial) y 6% en estadio V (Post-desove). Finalmente, en el tratamiento control positivo **T7**, el 33 % de los machos se encontraron en estadio 0 (Indiferenciado), 17% en estadio I (Espermatogénesis inicial), 16% en estadio II (Espermatogénesis avanzada) y 17% en estadio IV (Desove parcial) y 17% en estadio V (Post-desove).

En un análisis comparativo entre los diferentes tratamientos, se encontró que el mayor porcentaje de machos en estadio 0 (Indiferenciado) se presentó en el tratamiento **T4** con un 77%. El mayor porcentaje en estadio de I (Espermatogénesis inicial) se identificó en el tratamiento **T7** con un 16%. El estadio II (Espermatogénesis avanzada) se identificó en mayor porcentaje en el tratamiento **T2** con un 33%. Mientras que el estadio III (Madurez) se presentó en mayor porcentaje en el tratamiento **T6** con un 19%. El mayor porcentaje en estadio IV (Desove parcial) se presentó en el tratamiento **T1** con un 42% y el estadio V (Post-desove) se presentó en un mayor porcentaje en el tratamiento control positivo (**T7**) con un 17%.

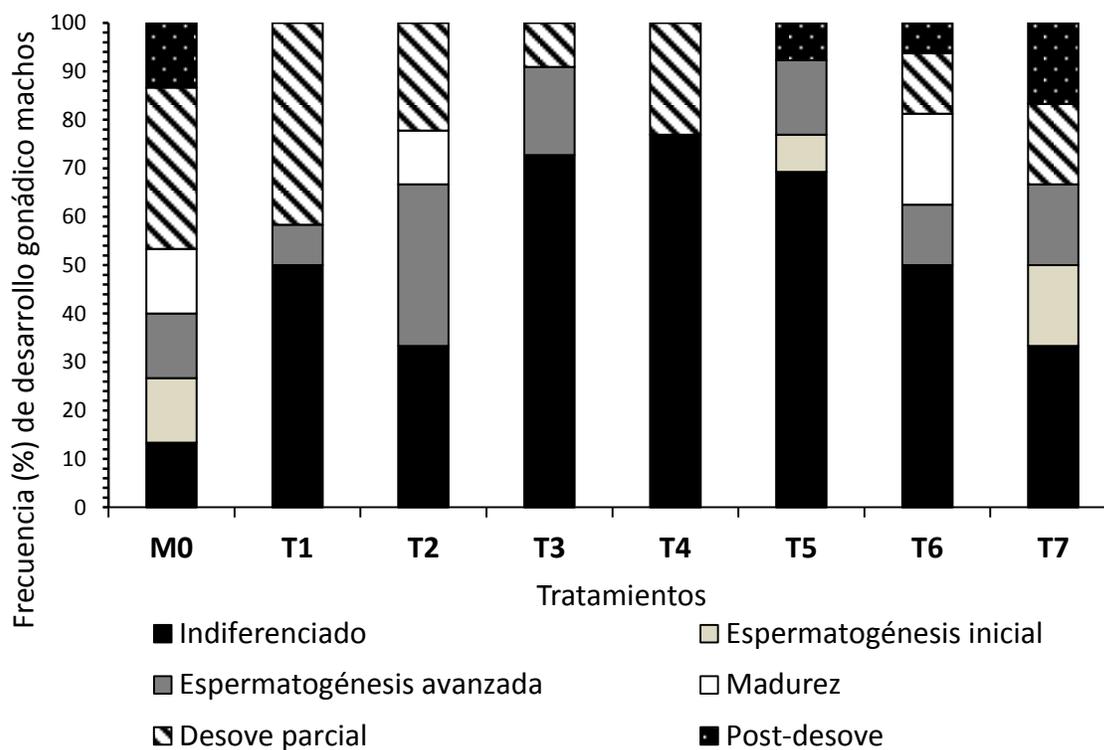


Figura 18.- Frecuencia (%) de desarrollo gonádico de machos de *Crassostrea virginica*, al inicio y final del bioensayo experimental. **M0**: Muestreo inicial, **T1**: RL8, **T2**: ViP 6C +ViA 6C, **T3**: PhA 6C+SiT 6C, **T4**: ViP 6C+ViA 6C+RL8, **T5**: PhA 6C+SiT 6C+RL8, **T6**: (Control positivo) alcohol de uso homeopático, **T7**: (Control negativo) agua destilada.

7.2 Frecuencia de ovocitos por tratamiento

Se caracterizaron cuatro tipos de ovocitos (oogonias, previtelogénicos, vitelogénicos y postvitelogénicos) y se identificaron ovocitos atrésicos. En las hembras del muestreo inicial (**M0**) se identificaron los cuatro tipos de ovocitos, oogonia con un 8%, previtelogénicos con un 17%, vitelogénicos con un 23%, postvitelogénicos con un 45% y un 7% de atresias. Al final del bioensayo experimental, los reproductores que recibieron los tratamientos **T1**, **T2**, **T3** y **T4**, mostraron altos porcentajes de ovocitos postvitelogénicos con porcentajes superiores al 80%. Con estos tratamientos se presentó el menor porcentaje de atresias (menor al 5%), a diferencia de los reproductores del **T7** que presentaron el mayor porcentaje de atresias (34%), y los de **T5** que mostraron el mayor porcentaje de ovocitos vitelogénicos con un 23% (Fig. 19).

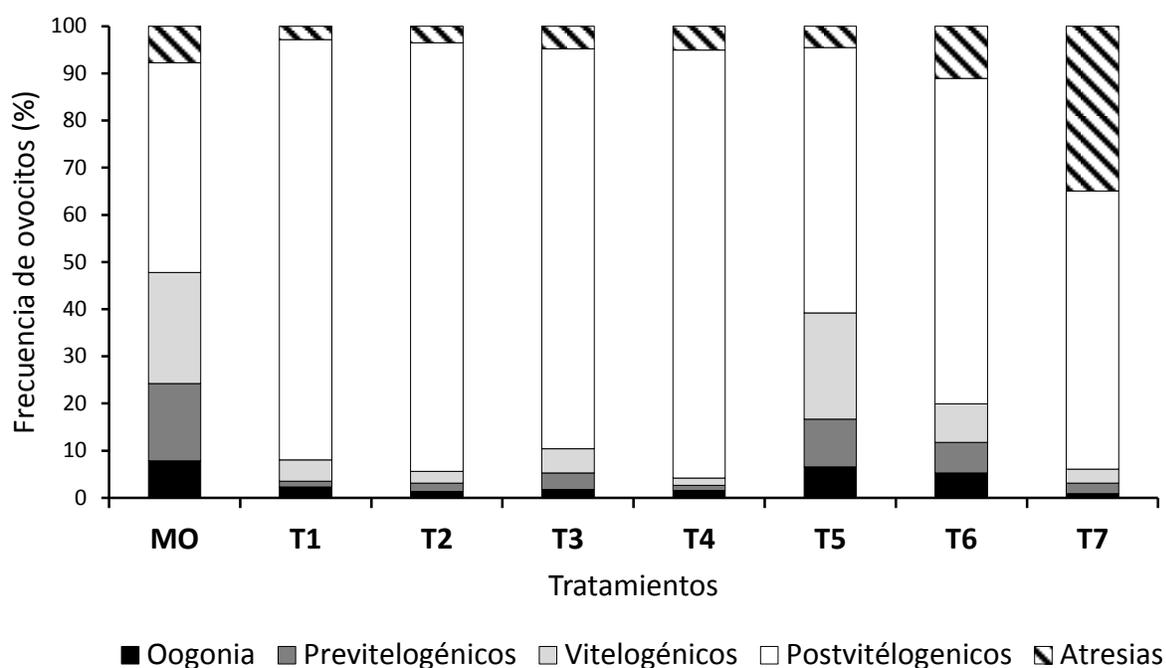


Figura 19.- Frecuencia (%) de ovocitos de hembras de *Crassostrea virginica* al inicio y final del bioensayo experimental. **M0**: Muestreo inicial, **T1**: RL8, **T2**: ViP 6C +ViA 6C, **T3**: PhA 6C+SiT 6C, **T4**: ViP 6C+ViA 6C+RL8, **T5**: PhA 6C+SiT 6C+RL8, **T6**: (Control positivo) alcohol de uso homeopático, **T7**: (Control negativo) agua destilada.

7.3 Triglicéridos y Fosfolípidos

La cuantificación y análisis de triglicéridos en los ovocitos de las hembras mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos. Los ovocitos de las hembras del muestreo inicial (**M0**), presentaron un 58% de triglicéridos. Al final del bioensayo experimental, los ovocitos de las hembras del tratamiento **T1** presentaron el mayor contenido de triglicéridos en ovocitos (73%) con relación a los ovocitos de las hembras de los otros tratamientos. El menor contenido de triglicéridos se observó en los ovocitos de las hembras del tratamiento **T4** con un 54% (Fig. 20).

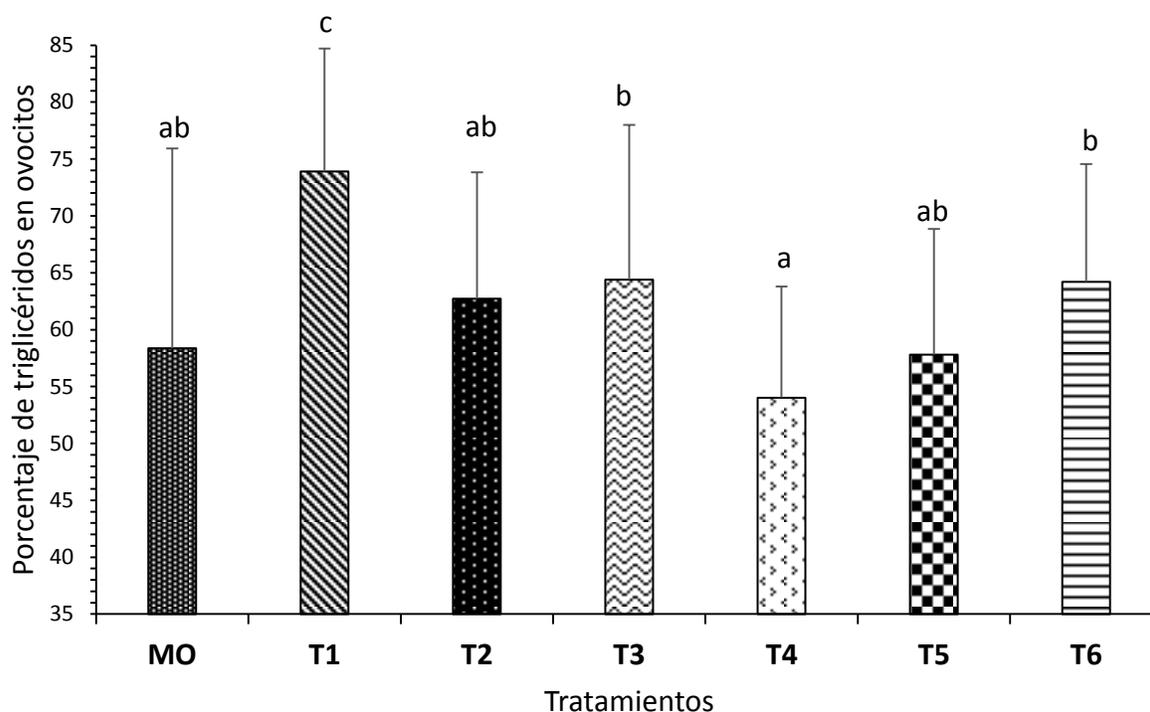


Figura 20.- Porcentaje de triglicéridos en ovocitos de hembras de *Crassostrea virginica*, al inicio y final del bioensayo experimental. **M0**: Muestreo inicial, **T1**: RL8, **T2**: ViP 6C +ViA 6C, **T3**: PhA 6C+SiT 6C, **T4**: ViP 6C+ViA 6C+RL8, **T5**: PhA 6C+SiT 6C+RL8, **T6**: (Control positivo) alcohol de uso homeopático.

El contenido de fosfolípidos en ovocitos (Fig. 21), fue significativamente diferente ($p < 0.05$) entre hembras tratadas con los diferentes tratamientos experimentales. Los ovocitos de las hembras del muestreo inicial (**M0**) presentaron un 34% de fosfolípidos. Al final del bioensayo experimental, el mayor contenido de fosfolípidos se observó en los ovocitos de las hembras del tratamiento **T4** (51%) y los ovocitos de las hembras del tratamiento **T1** presentaron el menor contenido de fosfolípidos (35%) con relación a los ovocitos de las hembras de los demás tratamientos.

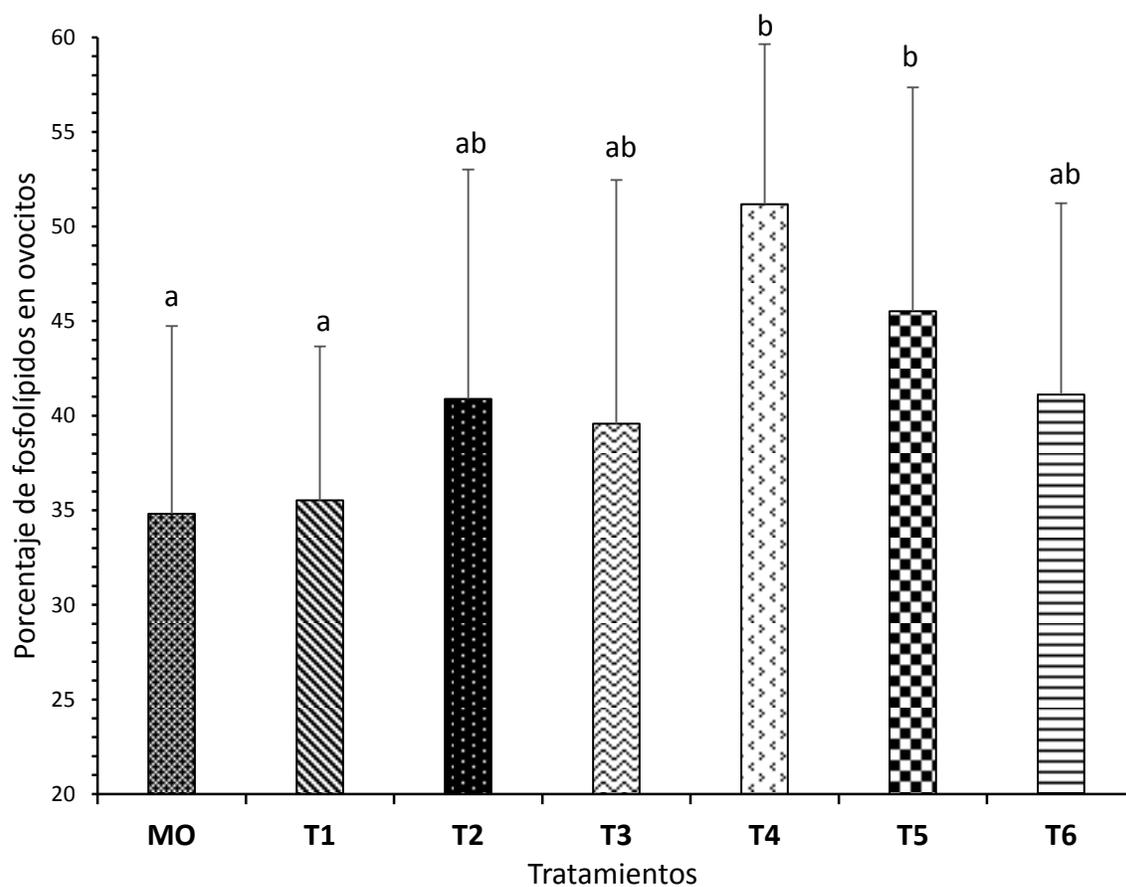


Figura 21.- Porcentaje de fosfolípidos en ovocitos de hembras de *Crassostrea virginica*, al inicio y final del bioensayo experimental. **M0:** Muestreo inicial, **T1:** RL8, **T2:** ViP 6C +ViA 6C, **T3:** PhA 6C+SiT 6C, **T4:** ViP 6C+ViA 6C+RL8, **T5:** PhA 6C+SiT 6C+RL8, **T6:** (Control positivo) alcohol de uso homeopático.

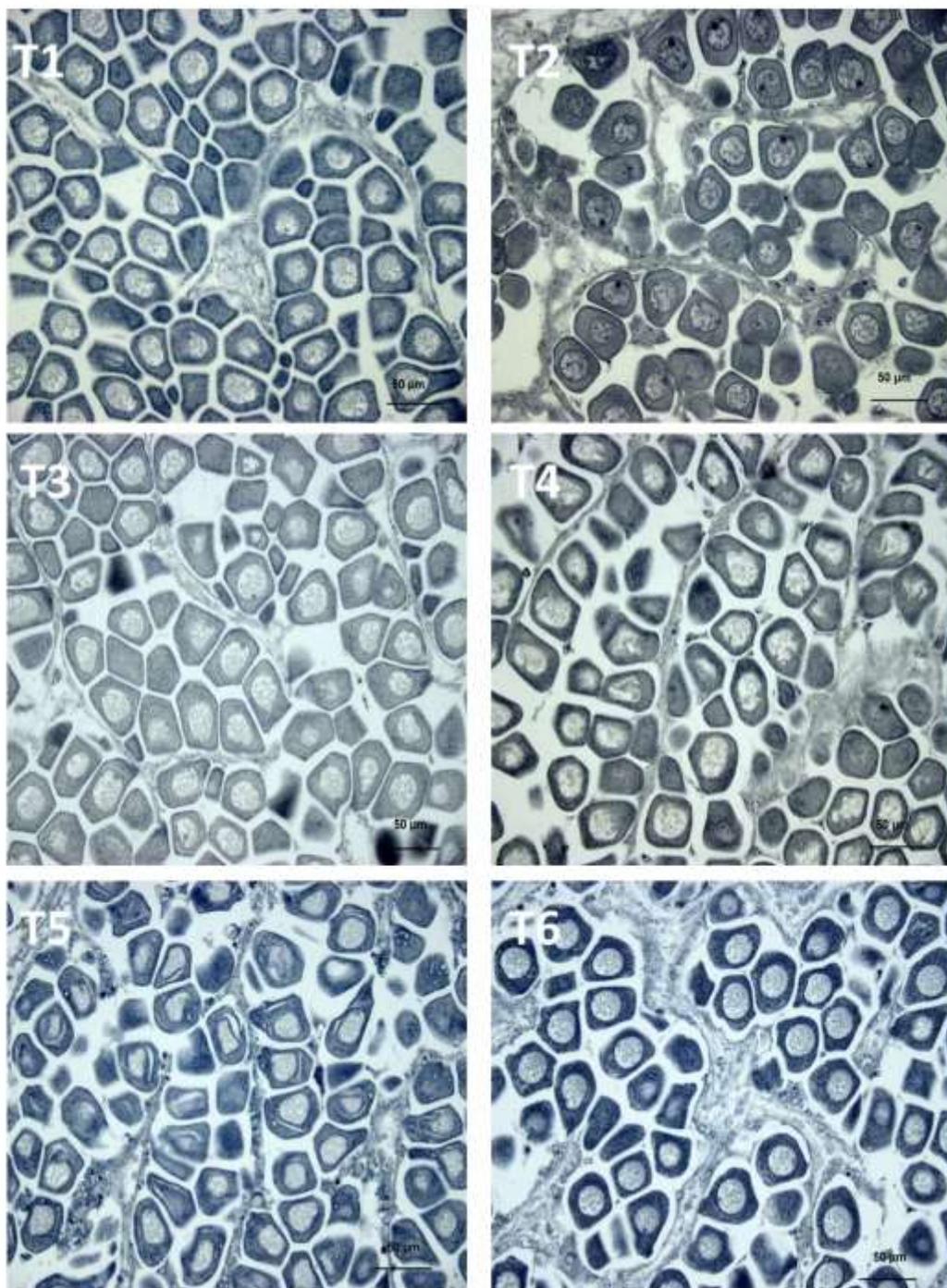


Figura 22.- Fotografías histológicas de cortes de gónada de hembras *Crassostrea virginica* con tinción histoquímica de Sudan negro. Tonos negro-azules corresponden a triglicéridos; tonos grises corresponden a fosfolípidos. **T1:** RL8, **T2:** ViP 6C +ViA 6C, **T3:** PhA 6C+SiT 6C, **T4:** ViP 6C+ViA 6C+RL8, **T5:** PhA 6C+SiT 6C+RL8, **T6:** (Control positivo) alcohol de uso homeopático. Imagen 400X; Barra de escala= 50 µm.

7.4 Diámetro teórico y relación núcleo/citoplasma (N/C)

El análisis estadístico de los valores del diámetro teórico de los ovocitos de las hembras de los diferentes tratamientos mostró diferencias significativas ($p < 0.05$). Los ovocitos de las hembras del muestreo inicial (**M0**), así como los de los tratamientos **T1**, **T2**, **T3**, **T4**, **T5** y **T6** presentaron un diámetro teórico de aproximadamente $40 \pm 5.2 \mu\text{m}$. El diámetro teórico de los ovocitos de las hembras del tratamiento **T7** fue significativamente menor (Fig. 23).

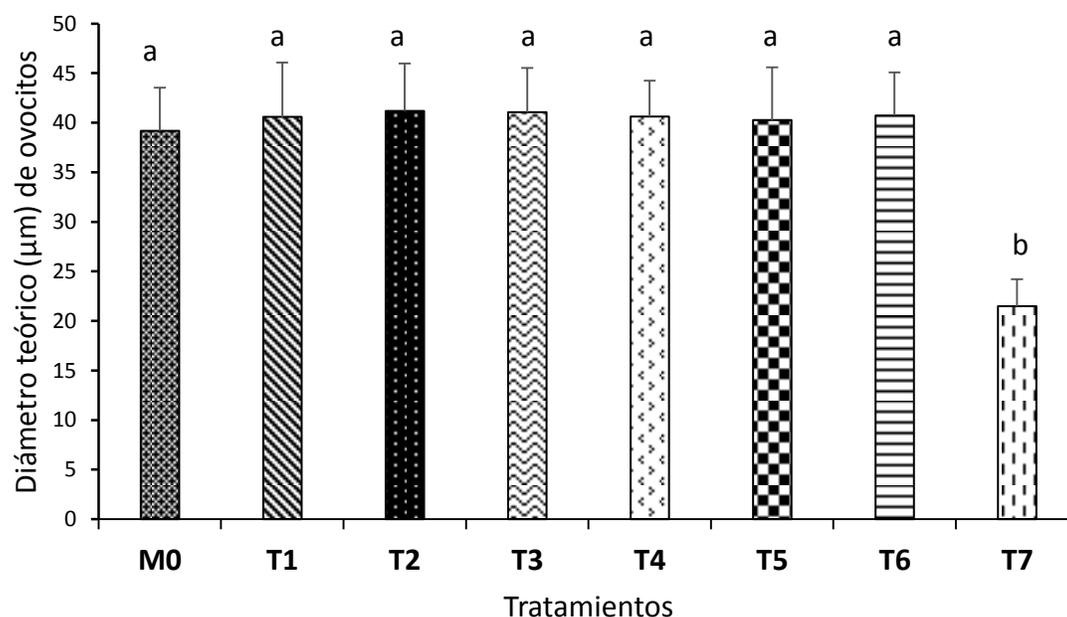


Figura 23.- Diámetro teórico (μm) de ovocitos de hembras de *Crassostrea virginica*. al inicio y final del bioensayo experimental. **M0**: Muestreo inicial, **T1**: RL8, **T2**: ViP 6C +ViA 6C, **T3**: PhA 6C+SiT 6C, **T4**: ViP 6C+ViA 6C+RL8, **T5**: PhA 6C+SiT 6C+RL8, **T6**: (Control positivo) alcohol de uso homeopático, **T7**: (Control negativo) agua destilada.

El análisis de la relación núcleo/citoplasma (N/C) de los ovocitos de las hembras mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos (Fig. 24). Los ovocitos de las hembras del muestreo inicial (**M0**) presentaron una relación N/C (32%) similar a la de los ovocitos de las hembras de los tratamientos **T1** (36%), **T2** (34%), **T3** (35%), **T5** (35%) y **T6** (39%) muestreadas al final del bioensayo experimental. La menor relación de N/C se obtuvo en los ovocitos de las hembras del tratamiento **T7** (26%) y la mayor relación se obtuvo en el tratamiento **T4** (41%).

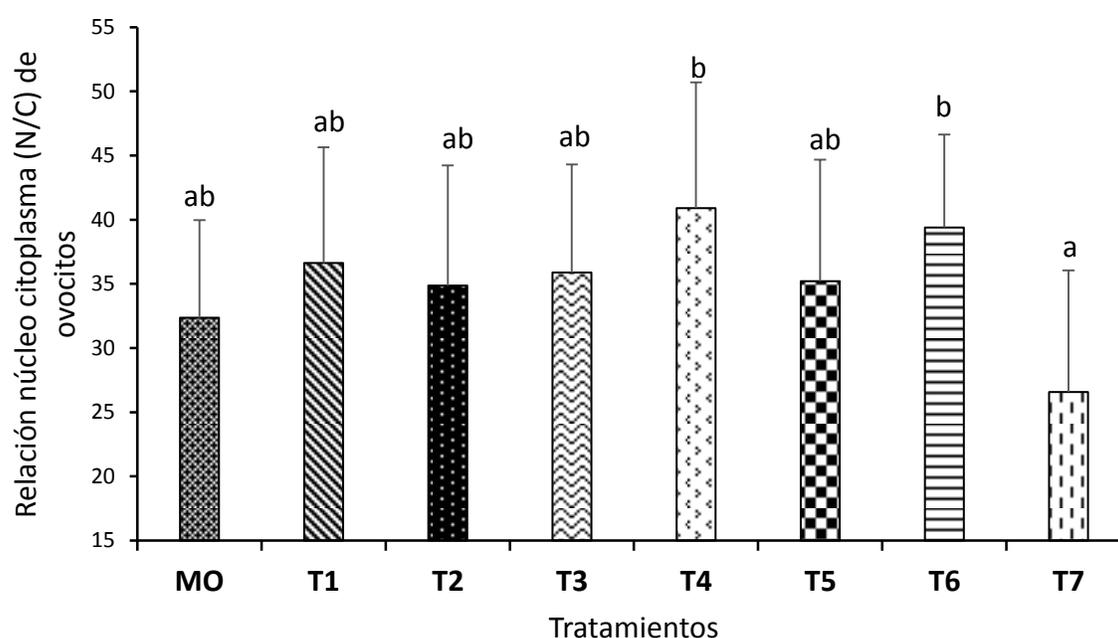


Figura 24.- Relación núcleo/citoplasma (N/C) de ovocitos de hembras de *Crassostrea virginica*, al inicio y final del bioensayo experimental. **M0**: Muestreo inicial, **T1**: RL8, **T2**: ViP 6C +ViA 6C, **T3**: PhA 6C+SiT 6C, **T4**: ViP 6C+ViA 6C+RL8, **T5**: PhA 6C+SiT 6C+RL8, **T6**: (Control positivo) alcohol de uso homeopático, **T7**: (Control negativo) agua destilada.

7.5 Área de cobertura de la glándula digestiva de hembras

En el análisis estadístico de los datos del indicador de la condición fisiológica general, área de cobertura de glándula digestiva en hembras, fue significativamente diferente ($p < 0.05$) entre las hembras tratadas con los distintos tratamientos experimentales (Fig. 25, Fig. 28). Las hembras del muestreo inicial (**M0**), presentaron un área de cobertura (24%) similar al de las hembras de los tratamientos **T1**, **T2**, **T5**, y control positivo (**T6**) muestreadas al final del bioensayo

experimental. La mayor área de cobertura se observó en las hembras del tratamiento **T4** (39%) y la menor (6%) en las hembras del control negativo (**T7**).

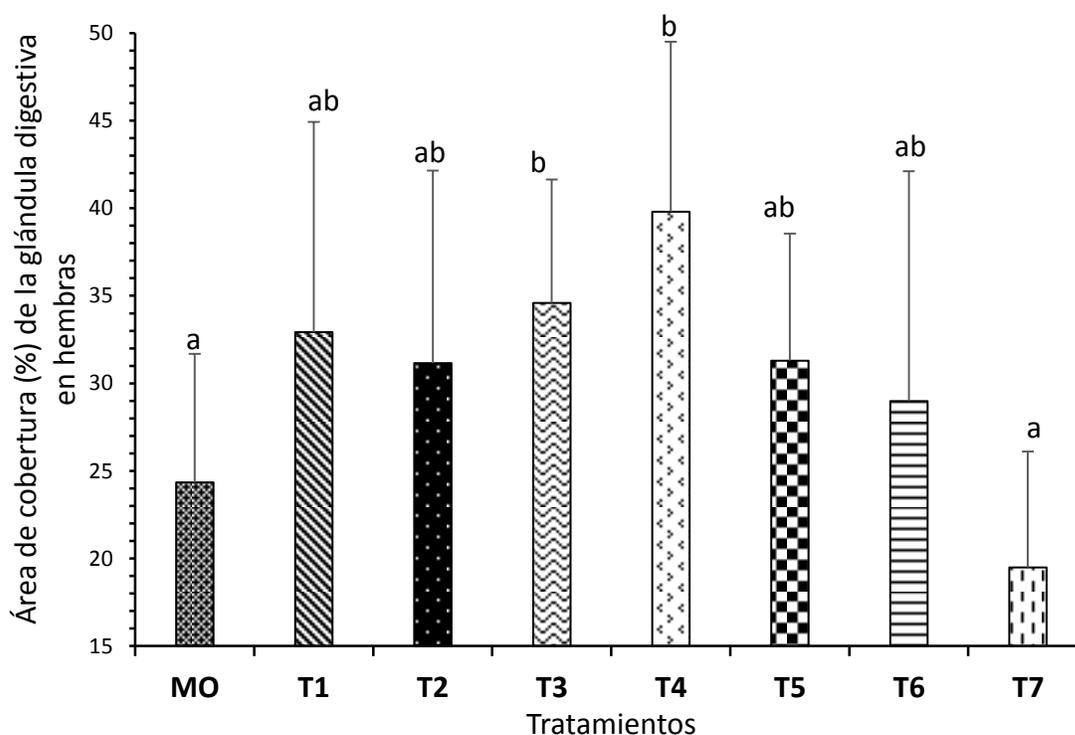


Figura 25.- Área de cobertura (%) de la glándula digestiva en hembras de *Crassostrea virginica*, al inicio y final del bioensayo experimental. **M0**: Muestreo inicial, **T1**: RL8, **T2**: ViP 6C +ViA 6C, **T3**: PhA 6C+SiT 6C, **T4**: ViP 6C+ViA 6C+RL8, **T5**: PhA 6C+SiT 6C+RL8, **T6**: (Control positivo) alcohol de uso homeopático, **T7**: (Control negativo) agua destilada.

7.6 Altura de los túbulos digestivos

En la altura de los túbulos digestivos (otro indicador de la condición fisiológica general) también se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) (Fig. 28). Los organismos del muestreo inicial (**M0**) presentaron una altura de los túbulos digestivos de $31.0 \pm 12 \mu\text{m}$, y fue similar a la obtenida en los organismos de los tratamientos **T1**, **T2**, **T3** y **T4** muestreados al final del bioensayo experimental. La mayor altura de los túbulos digestivos se observó en los organismos del tratamiento **T1** ($40.0 \pm 18 \mu\text{m}$) y la menor se observó en los organismos del tratamiento **T5** ($17.0 \pm 3.6 \mu\text{m}$), y en los dos tratamientos control **T6** ($14.0 \pm 3.1 \mu\text{m}$) y **T7** ($15.0 \pm 4.1 \mu\text{m}$) (Fig. 26).

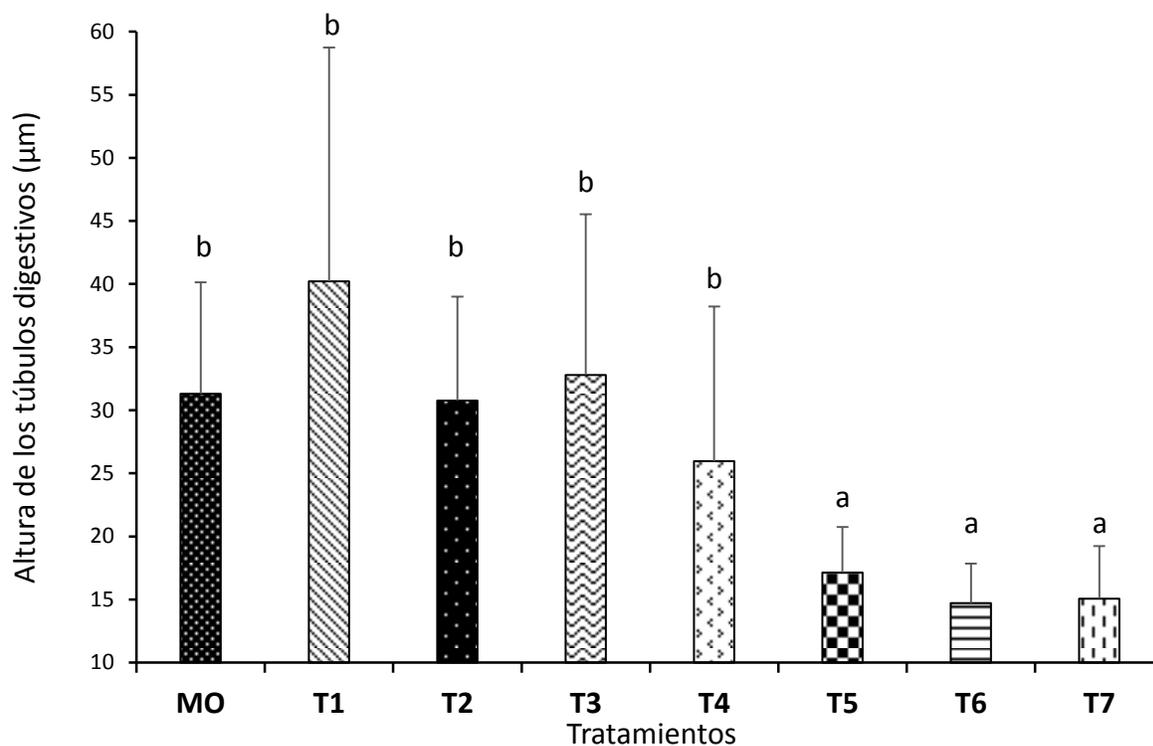


Figura 26.- Altura de los túbulos digestivos (μm) de organismos de *Crassostrea virginica*, al inicio y final del bioensayo experimental. **M0**: Muestreo inicial, **T1**: RL8, **T2**: ViP 6C +ViA 6C, **T3**: PhA 6C+SiT 6C, **T4**: ViP 6C+ViA 6C+RL8, **T5**: PhA 6C+SiT 6C+RL8, **T6**: (Control positivo) alcohol de uso homeopático, **T7**: (Control negativo) agua destilada.

7.7 Conteo de hemocitos

El análisis del conteo de hemocitos (Fig. 27, Fig. 28) realizado en los organismos mostró diferencias significativas ($p < 0.05$). Los organismos obtenidos en el muestreo inicial (**M0**) presentaron un número promedio de hemocitos de 56 en un área de 0.21 mm^2 . Al final del bioensayo experimental, los organismos del tratamiento **T1** presentaron el mayor número de hemocitos (76 en un área de 0.21 mm^2) y los organismos del tratamiento **T6** (control positivo) presentaron el menor número de hemocitos (27 en un área de 0.21 mm^2).

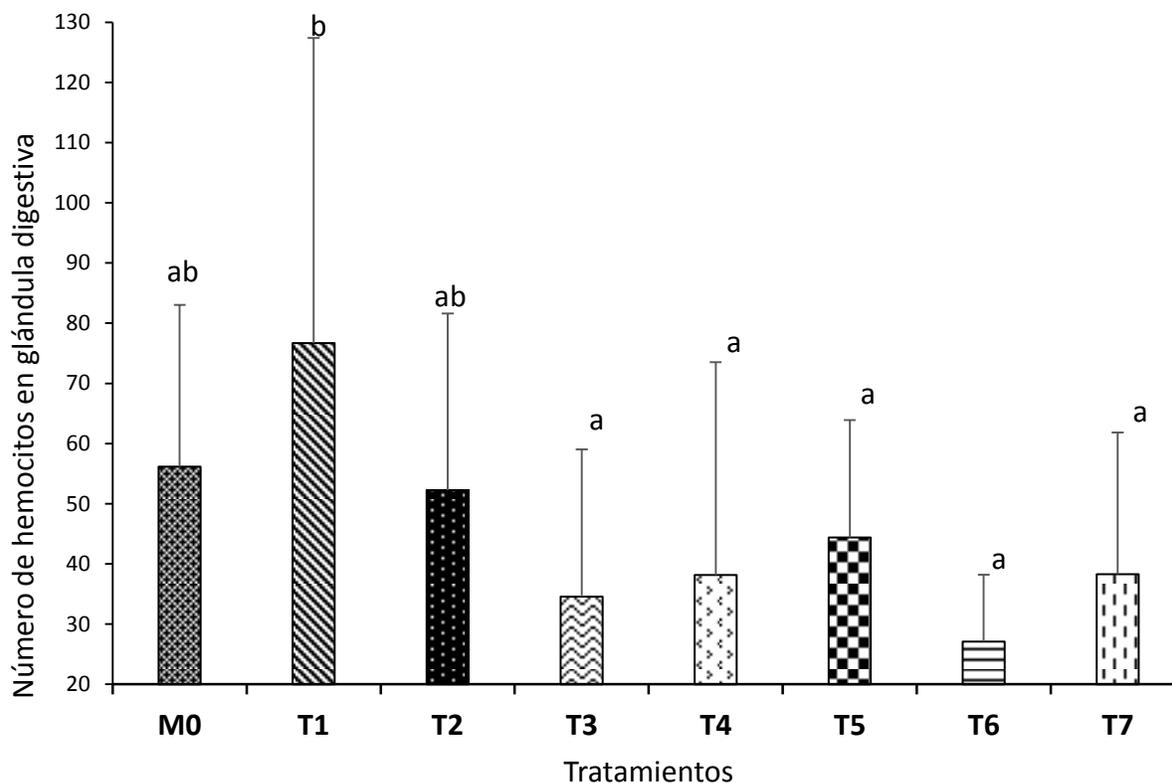


Figura 27.- Número de hemocitos en glándula digestiva de organismos de *Crassostrea virginica*, obtenidos en cortes histológicos en un área de tejido de 0.21 mm², al inicio y final del bioensayo experimental. **M0**: Muestreo inicial, **T1**: RL8, **T2**: ViP 6C +ViA 6C, **T3**: PhA 6C+SiT 6C, **T4**: ViP 6C+ViA 6C+RL8, **T5**: PhA 6C+SiT 6C+RL8, **T6**: (Control positivo) alcohol de uso homeopático, **T7**: (Control negativo) agua destilada.

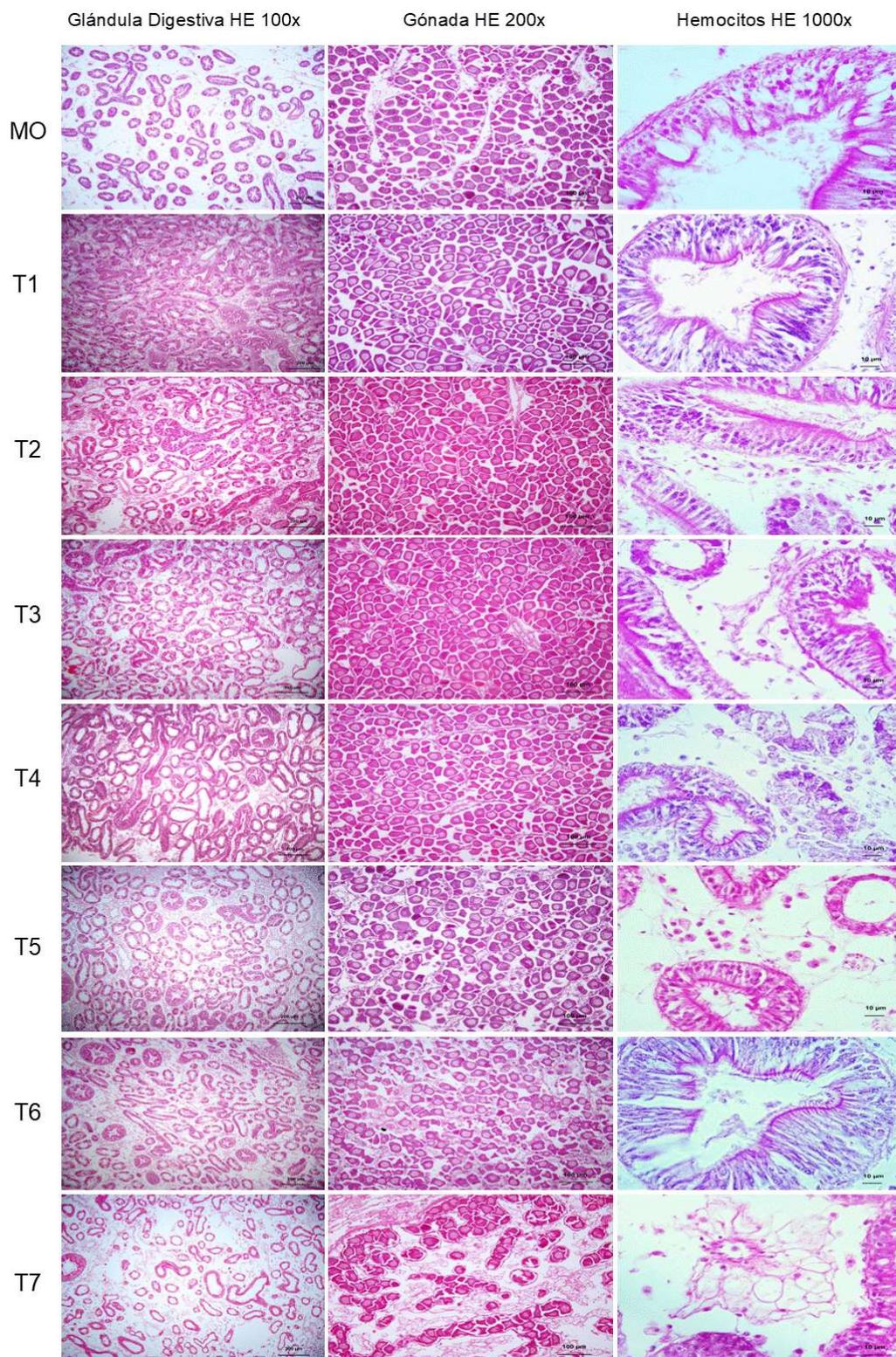


Figura 28.- Micrografías de glándula digestiva, gónada y hemocitos en glándula digestiva de *Crassostrea virginica*. Tinción de Hematoxilina-Eosina (100X barra de escala=200 μ m; 200X barra de escala= 100 μ m y 1000X barra de escala= 10 μ m). **MO**: Muestreo inicial, **T1**: RL8, **T2**: ViP 6C +ViA 6C, **T3**: PhA 6C+SiT 6C, **T4**: ViP 6C+ViA 6C+RL8, **T5**: PhA 6C+SiT 6C+RL8, **T6**: (Control positivo) alcohol de uso homeopático, **T7**: (Control negativo) agua destilada.

7.8 Extracción de ARN total y Síntesis de ADNc

Los resultados de la electroforesis permitieron seleccionar las muestras que mostraron un ARN íntegro (28S y 18S del ARNr visible) (Fig. 29), para realizar la síntesis de ADNc. Las muestras con un ARN no íntegro se eliminaron del análisis. La amplificación por PCR del gen β -Actina permitió verificar la correcta síntesis de ADNc de cada una de las muestras para ser utilizadas en los análisis de expresión génica (Fig. 30). Para corroborar la eficiencia de la síntesis, las muestras de ADNc que no mostraron el amplicón correspondiente al gen de β -Actina se amplificaron nuevamente. En caso de no obtener un segundo resultado satisfactorio se repitió la síntesis de ADNc de esas muestras.

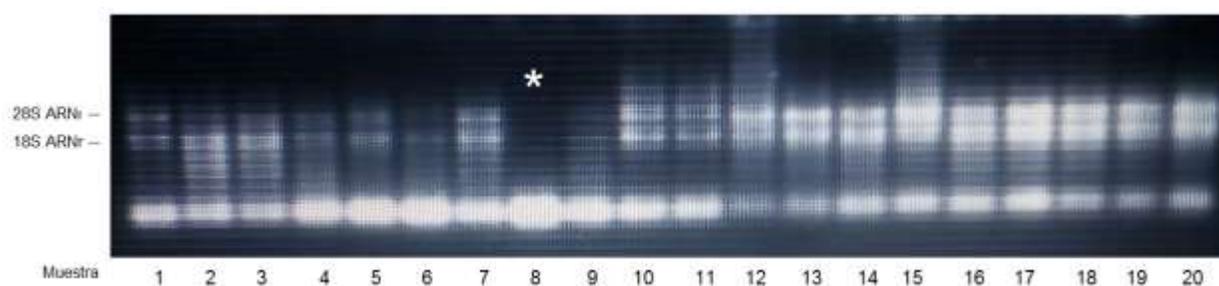


Figura 29.- Electroforesis de ARN de gónada (muestras de la 1 a la 5), manto (muestras de la 6 a la 10), branquia (muestras de la 11 a la 15) y glándula digestiva (muestras de la 16 a la 20) de cinco individuos de *Crassostrea virginica*. La muestra 8 (*) muestra un ARN no-íntegro.

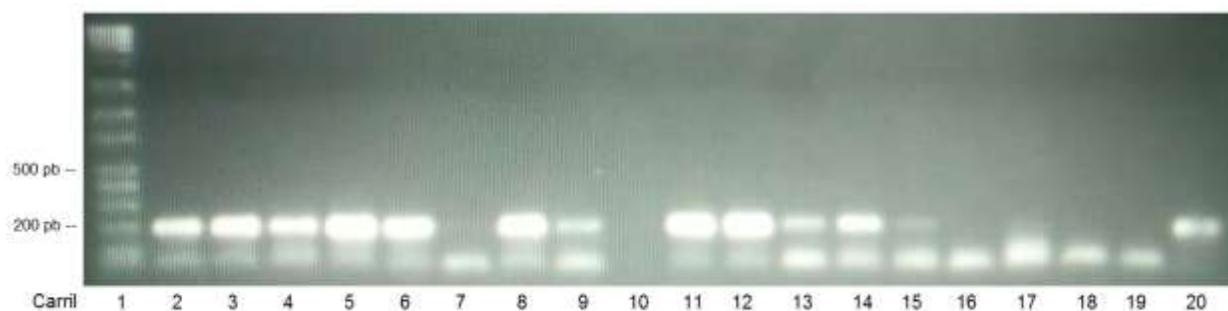


Figura 30.- Electroforesis de la amplificación del ADNc sintetizado a partir de ARN total de los tejidos gónada (muestras de la 1 a la 5), manto (muestras de la 6 a la 10), branquia (muestras de la 11 a la 15) y glándula digestiva (muestras de la 16 a la 19) de *Crassostrea virginica*, realizada con el gen β -Actina con un tamaño de amplicón de 145 pb. Carril 1 (Marcador de peso molecular). Carril 20 (Muestra de ADNc de *Crassostrea gigas* (positivo)).

7.9 Expresión relativa de genes asociados a la respuesta inmune

De los tres genes de referencia utilizados (FE, 28S ribosomal y β -Actina), dos fueron los más estables (FE y 28S) según el programa RefFinder, (Fig. 31) por lo cual fueron utilizados en el análisis de expresión d

e los genes (blanco) asociados a la respuesta inmune y proceso reproductivo.

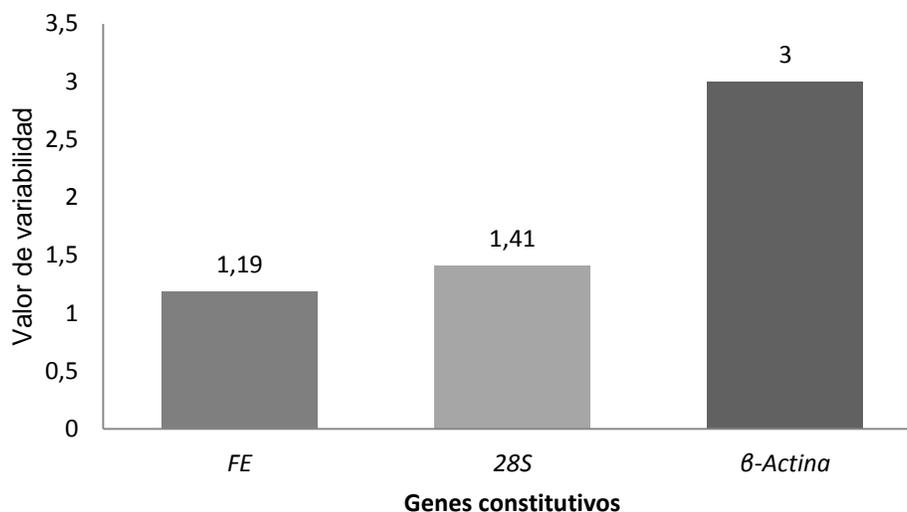


Figura 31.- Estabilidad de los genes de referencia estimada con RefFinder. Los genes más estables fueron utilizados para la normalización de la expresión relativa de los genes blanco-analizados. FE= Factor de Elongación, 28S= 28S ribosomal y Beta-actina= β -Actina.

Los resultados de los niveles de expresión relativa del gen Lectina tipo C (LEC) indicaron diferencias significativas ($p < 0.05$), en los tejidos de los organismos de los tratamientos experimentales. Los mayores niveles de expresión se registraron en la glándula digestiva de los organismos de los tratamientos **T1** (4.12 ± 10.30) y del control positivo **T6** (3.97 ± 3.73). Y los menores niveles se presentaron en los organismos del tratamiento **T7** en glándula digestiva (0.0 ± 2.09) y branquia (0.0 ± 0.0) (Fig. 32). En cuanto al manto (1.88 ± 13.13), se observaron mayores niveles de expresión en los organismos del tratamiento **T1**. Y en branquia (1.72 ± 2.09) los mayores niveles se presentaron en los organismos del tratamiento **T5**.

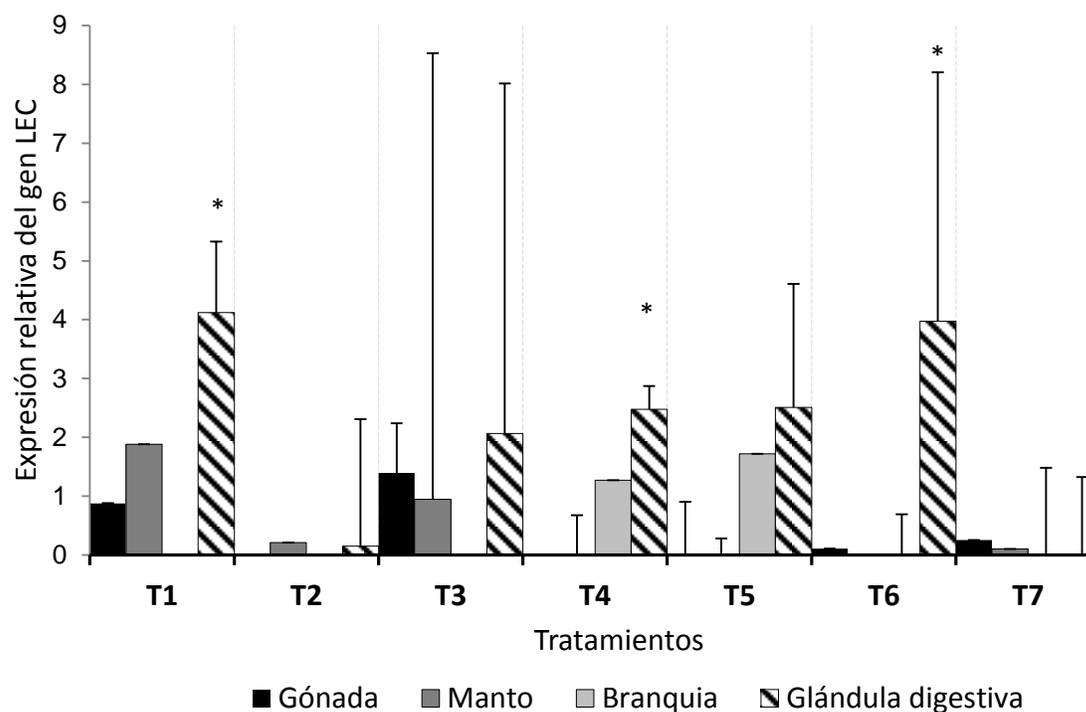


Figura 32.- Expresión relativa del gen Lectina tipo C (LEC) en gónada, manto, branquia y glándula digestiva del ostión *Crassostrea virginica*. Los asteriscos indican diferencias significativas. El análisis estadístico entre Tratamientos mostró diferencias estadísticas ($p < 0.05$) y de igual manera entre Tejidos vs Tratamientos ($p < 0.05$). Las barras verticales representan las medias \pm el error estándar. **T1:** RL8, **T2:** ViP 6C +ViA 6C, **T3:** PhA 6C+SiT 6C, **T4:** ViP 6C+ViA 6C+RL8, **T5:** PhA 6C+SiT 6C+RL8, **T6:** (Control positivo) etanol de uso homeopático, **T7:** (Control negativo) agua destilada.

Los análisis de la expresión del gen Glutathione S-transferasa (GSTO), analizada en los diferentes tejidos de *C. virginica*, no mostraron diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$) (Fig. 33); aunque los mayores niveles se observaron en la branquia (2.02 ± 4.85) de los organismos del tratamiento **T4**.

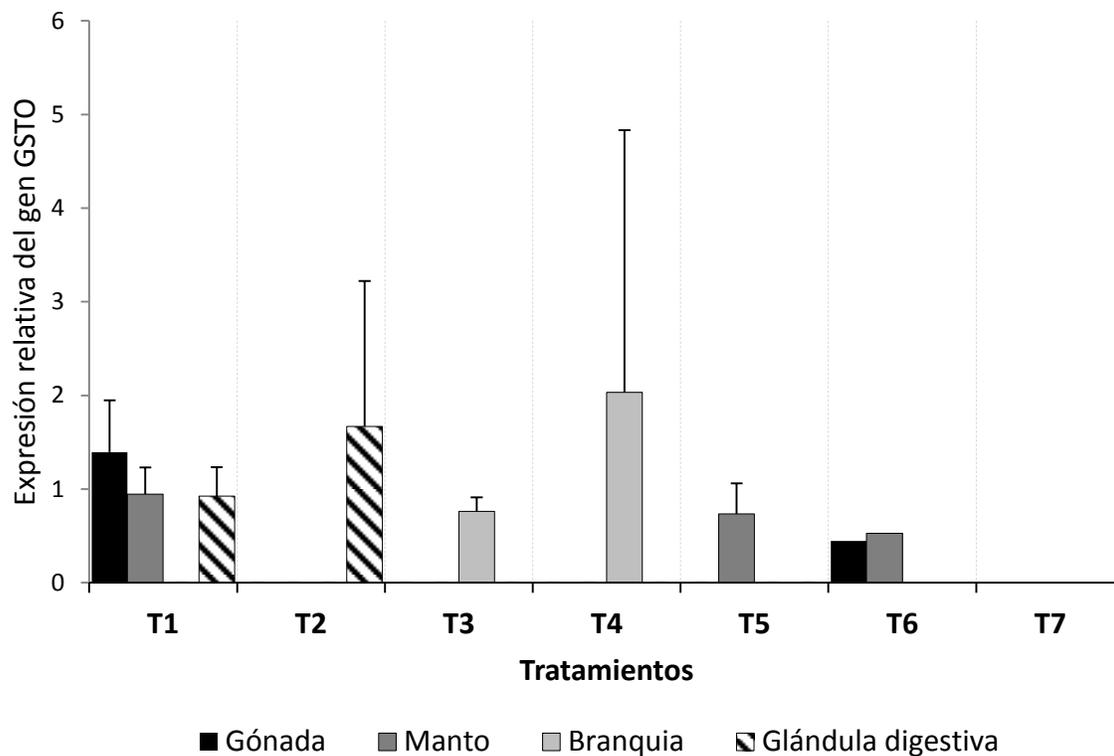


Figura 33.- Expresión relativa del gen Glutación S-transferasa (GSTO), en gónada, manto, branquia y glándula digestiva del ostión *Crassostrea virginica*. Las barras verticales representan las medias \pm el error estándar. **T1:** RL8, **T2:** ViP 6C +ViA 6C, **T3:** PhA 6C+SiT 6C, **T4:** ViP 6C+ViA 6C+RL8, **T5:** PhA 6C+SiT 6C+RL8, **T6:** (Control positivo) etanol de uso homeopático, **T7:** (Control negativo) agua destilada.

7.10 Expresión relativa de genes asociados al proceso reproductivo

En cuanto al gen de vitelogenina (VTG) se observó expresión en todos los tejidos y diferencias significativas ($p < 0.05$). Los mayores niveles de expresión se presentaron en la glándula digestiva (0.53 ± 0.09) de los organismos del tratamiento **T7** y en la gónada (0.40 ± 0.03) de los organismos del tratamiento **T1**. En manto (0.27 ± 0.01), los mayores niveles de expresión se observaron en los organismos del tratamiento **T7**, y en branquia (0.14 ± 0.09) en los organismos del tratamiento **T4** (Fig. 34).

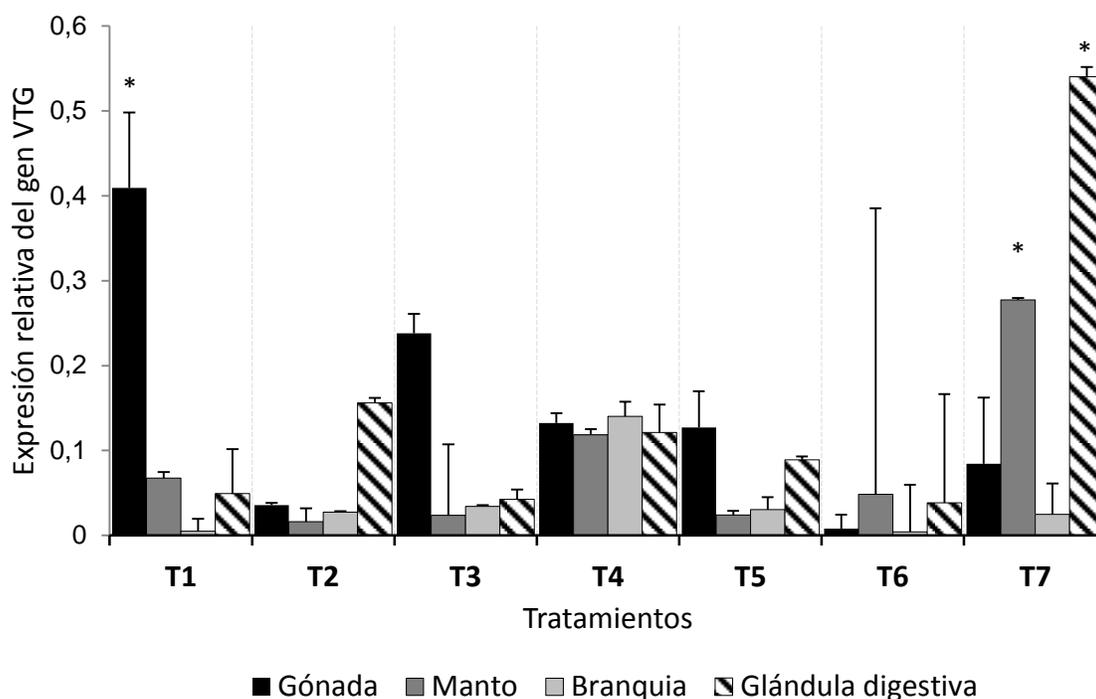


Figura 34.- Expresión relativa del gen vitelogenina (VTG) en gónada, manto, branquia y glándula digestiva del ostión *Crassostrea virginica*. Los asteriscos indican diferencias significativas. El análisis estadístico entre tratamientos mostró diferencias estadísticas ($p < 0.05$) y entre Tejidos vs Tratamientos ($p < 0.05$). Las barras verticales representan las medias \pm el error estándar. **T1:** RL8, **T2:** ViP 6C +ViA 6C, **T3:** PhA 6C+SiT 6C, **T4:** ViP 6C+ViA 6C+RL8, **T5:** PhA 6C+SiT 6C+RL8, **T6:** (Control positivo) etanol de uso homeopático, **T7:** (Control negativo) agua destilada.

Respecto al gen AF2 (Activation Functions 2) analizado en los diferentes tejidos de los organismos de *C. virginica* (Fig. 35) se observaron diferencias estadísticas ($p < 0.05$). Los mayores niveles de expresión se presentaron en la glándula digestiva de los organismos de los tratamientos **T2** (3.50 ± 4.10) y **T5** (3.48 ± 1.16). Los organismos del tratamiento **T5** también mostraron los mayores niveles de expresión en gónada (2.72 ± 2.16). En cuanto al manto (1.13 ± 0.53), los mayores niveles se observaron en los organismos del tratamiento **T6** (Control positivo) y en la branquia (0.97 ± 2.81) en los organismos del tratamiento **T4**.

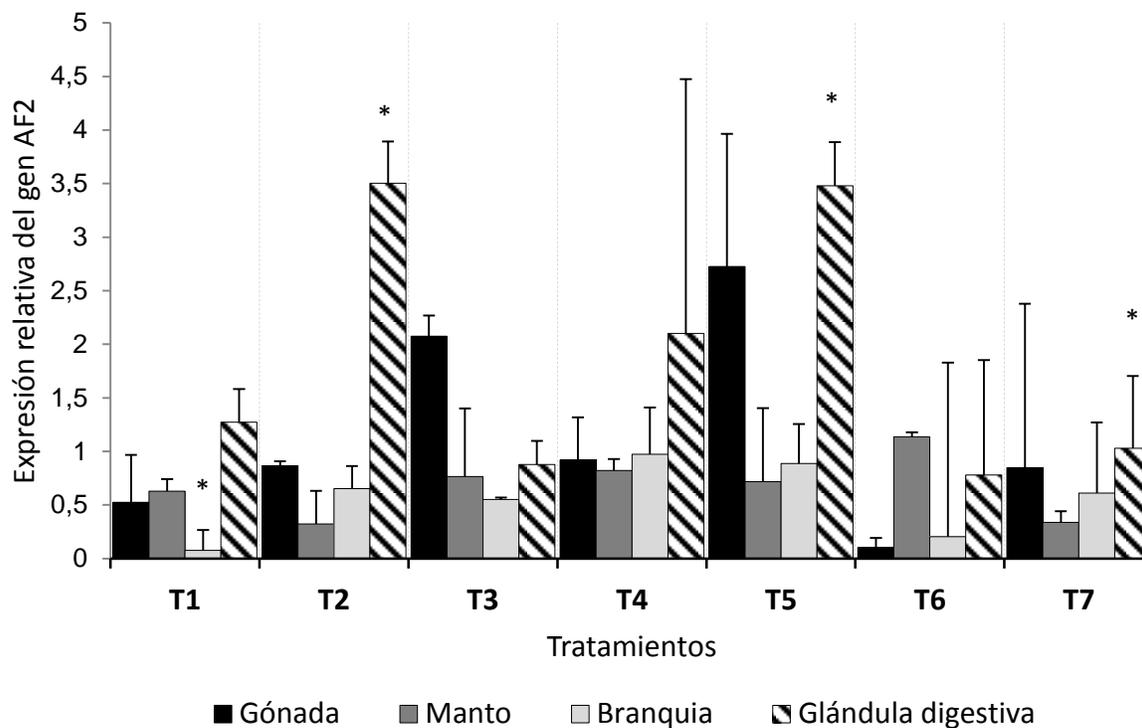


Figura 35.- Expresión relativa del gen AF2 (Activation Functions 2) en gónada, manto, branquia y glándula digestiva del ostión *Crassostrea virginica*. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Las barras verticales representan las medias \pm el error estándar. **T1:** RL8, **T2:** ViP 6C +ViA 6C, **T3:** PhA 6C+SiT 6C, **T4:** ViP 6C+ViA 6C+RL8, **T5:** PhA 6C+SiT 6C+RL8, **T6:** (Control positivo) etanol de uso homeopático, **T7:** (Control negativo) agua destilada.

8. DISCUSIÓN

La producción de semillas de ostreidos está intrínsecamente ligada a la disponibilidad de reproductores con una calidad nutricional óptima, que les permita alcanzar una mayor capacidad reproductiva (Chávez-Villalba, 2014). Esto incluye tanto la eficiencia en la producción y liberación de gametos en términos de cantidad y calidad, como el éxito amplificado en los procesos de fertilización y desarrollo larvario, fijación y preengorda. Mejorar la capacidad reproductiva, respuesta inmune y calidad nutricional de los reproductores en los laboratorios productores de semilla de ostreidos es una prioridad fundamental para la industria ostrícola (García-Bernal *et al.*, 2020; Mazón-Suástegui *et al.*, 2020). En el Golfo de México, el COTET desempeña un papel crucial en la ostricultura, mediante la oferta regular, controlada y sostenible de semilla individual o en concha, de *C. virginica*, en comparación con la forma tradicional y azarosa de recolección de semillas directamente del medio natural.

La producción de semillas está intrínsecamente ligada a la presencia de reproductores con una calidad nutricional óptima, que les permita alcanzar una mayor capacidad reproductiva (Chávez-Villalba, 2014). En el caso de los ostreidos, esta capacidad reproductiva abarca tanto la eficiencia en la producción y liberación de gametos en términos de cantidad y calidad, como el éxito amplificado en el proceso de fertilización. Con la intención de explorar nuevas alternativas para enriquecer la condición fisiológica y nutricional de los organismos bajo cultivo, el presente estudio ha focalizado su atención en la evaluación de CBAD y ACTIN para evaluar su acción por separado y sinérgica. Estos compuestos, además de ser eco-amigables, presentan la ventaja de no desencadenar reacciones adversas. Destacan por su capacidad de interactuar con los sistemas biológicos y de potencialmente activar mecanismos moleculares para favorecer la salud de los organismos marinos (López-Carvallo *et al.*, 2020; García-Bernal *et al.*, 2020; López-Carvallo *et al.*, 2021;). Tanto los CBAD como los ACTIN ponen en funcionamiento mecanismos fisiológicos que se traducen en efectos favorables en la acumulación de reservas energéticas y modulación de respuesta inmune en varias especies de peces, crustáceos y moluscos de importancia comercial que permiten incrementar rendimientos productivos (Mazón-Suástegui *et al.*, 2017; Rosero-García, 2017; Ibarra-García, 2018; Rosero-García *et al.*, 2019; López-Carvallo *et al.*, 2019; García-Bernal *et al.*, 2020). Por lo anterior, en esta investigación de maestría se

evaluó el efecto individual y sinérgico de tratamientos formulados con CBAD y ACTIN en el desarrollo gonádico, respuesta inmune y calidad nutricional de reproductores de *C. virginica* en un laboratorio ostrícola comercial (COTET) ubicado en el Estado de Tabasco (Golfo de México).

Los resultados obtenidos indican que los porcentajes más altos de ovocitos postvitelogenicos (con porcentajes superiores al 80%), el menor porcentaje de atresias (5%), los niveles más altos de expresión del gen de VTG en gónada, la mayor relación N/C de ovocitos postvitelogenicos y el mayor contenido de triglicéridos, se observaron en las hembras que recibieron el tratamiento T1 (formulado con ACTIN = Cepa RL8 del actinomiceto marino *Streptomyces sp.*), y el menor contenido en hembras que recibieron el tratamiento T4 (formulado con CBAD y ACTIN = ViP 6C + ViA 6C + RL8). Estos resultados permiten asumir que los CBAD aplicados de manera individual o en sinergia con ACTIN, pueden mejorar el proceso de gametogénesis/vitelogénesis de las hembras de *C. virginica*, lo cual es de gran importancia por su impacto directo en la supervivencia embrionaria y larvaria de esta especie nativa del Golfo de México. Al respecto, se han realizado estudios experimentales con el mejillón Café *M. capax* en donde se evaluó la combinación de los CBAD (ViA-ViP) desarrollados en CIBNOR a partir de lisados bacterianos de cepas patógenas (ViA= *Vibrio alginolyticus* y ViP= *V. parahaemolyticus*) y se observó una mejora de la maduración gonádica, con un incremento de las reservas energéticas en gónada y en ovocitos con una disminución de atresias (García-Corona, 2018).

Los resultados también indicaron que otros tratamientos como el T2 (formulado con los CBAD ViP 6C +ViA 6C) y el T3 (formulado con los CBAD PhA 6C+SiT 6C) incrementaron el porcentaje de ovocitos postvitelogénicos con un menor porcentaje de atresias y adicionalmente, los tratamientos T2 y T5 (formulado con CBAD + ACTIN = PhA 6C+SiT 6C+RL8) incrementaron en glándula digestiva y gónada los niveles de expresión del gen AF2 (Activation Functions 2) un receptor nuclear de hormonas esteroideas. Esta respuesta puede ser atribuida a que la madurez de la gónada se ve favorecida por la aplicación de CBAD. Al respecto, varios estudios han sido enfocados en incrementar la maduración gonádica, calidad ovocitaria y la condición fisiológica general con la aplicación de la combinación de los CBAD PhA (*Phosphoricum acid*, Similia® MX) y SiT (Silicea Terra, Similia® MX) en almeja Catarina *A. ventricosus* y *M. capax* (García-Corona,

2018, Mazón-Suastegui *et al.*, 2018a) con resultados positivos. De igual manera, microorganismos con acción probiótica como los actinomicetos marinos pueden desencadenar la síntesis de enzimas extracelulares como proteasas, lipasas y amilasas, mejorando la función digestiva y la acumulación de nutrientes como lípidos neutros que serán utilizados en los procesos de maduración gonádica (Prado *et al.*, 2010; Seenivasan *et al.*, 2016; Fdhila *et al.*, 2017; Adel *et al.*, 2017; Sumon *et al.*, 2018; Amoah *et al.*, 2020).

La maduración gonádica en moluscos bivalvos está directamente relacionada con factores ambientales y con la disponibilidad y calidad del alimento disponible. Estos factores tienen la capacidad de activar mecanismos endocrinos que desencadenan una serie de procesos bioquímicos que promueven la maduración sexual (Kimmel y Newell, 2007; Baqueiro *et al.*, 2007; Matsumoto *et al.*, 2008; Guzmán-García *et al.*, 2009; Mann *et al.*, 2014). Ante lo anterior, es de suma importancia mejorar la condición fisiológica general y/o nutricional de los organismos en cultivo, con un enfoque prioritario al *stock* reproductivo.

Los resultados del presente estudio mostraron que los dos indicadores de condición nutricional (área de cobertura de la glándula digestiva y altura de los túbulos digestivos) fueron mayores en los organismos del tratamiento T4 (formulado con CBAD y ACTIN = ViP 6C+ViA 6C+RL8) y T1 (formulado con ACTIN= la cepa RL8 del actinomiceto marino *Streptomyces sp.*) respectivamente. En algunos organismos de importancia pesquera y acuícola como la almeja Catarina *A. ventricosus* se han realizado diversos estudios para entender su respuesta fisiológica y metabólica ante la aplicación profiláctica (preventiva) de CBAD como ViP-ViA 7C y PhA-SiT 7C, en los que se han registrado incrementos significativos en crecimiento y variables de respuesta fisiológica como lo son las reservas energéticas (López-Carvallo *et al.*, 2019).

La importancia de incrementar las reservas energéticas durante el proceso reproductivo en ostreidos ha sido descrito en estudios de fisiología y metabolismo energético, donde se ha puntualizado que la cantidad de lípidos en gónada está estrechamente relacionada con su transporte desde la glándula digestiva, para satisfacer las demandas de los diferentes estadios de desarrollo gonádico. Los triglicéridos y fosfolípidos ayudan a que las hembras puedan

generar ovocitos con una alta calidad, indispensables para el posterior desarrollo larvario (Fabioux *et al.*, 2005; Palacios *et al.*, 2007; Gómez-Robles *et al.*, 2013; López-Carvallo *et al.*, 2017). Estos factores energéticos-estructurales también influyen en el diámetro teórico de los ovocitos en los bivalvos (Gómez-Robles *et al.*, 2005; Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2008).

Conforme a nuestros resultados, los ovocitos de *C. virginica* presentaron un diámetro teórico promedio de 45 μm , considerado saludable para obtener larvas saludables de bivalvos con alta calidad en términos de supervivencia (Gómez-Robles *et al.*, 2005; Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2008). Igualmente, la relación núcleo/citoplasma (N/C) se relaciona con estos factores debido a que se basa en el crecimiento alométrico del ooplasma con respecto al núcleo, ya que el núcleo deja de crecer durante la vitelogénesis, mientras que el ooplasma sigue creciendo por acumulación gradual de lípidos y proteínas esenciales para la maduración del ovocito (Gómez-Robles *et al.*, 2005; García-Corona, 2018). Al respecto, Gómez-Robles *et al.* (2005), encontraron una correlación positiva y significativa entre la relación N/C y los valores de lípidos almacenados en los ovocitos. En el presente estudio, los resultados indicaron que las hembras del tratamiento T4 presentaron una mayor relación de N/C y una mayor área de cobertura de la glándula digestiva. El tratamiento T4 fue formulado para evaluar el efecto sinérgico de CBAD y ACTIN (ViP 6C+ViA 6C+RL8), por lo que se puede considerar que los CBAD-ACTIN, pueden mejorar el proceso de gametogénesis/vitelogénesis y la condición nutricional de las hembras de *C. virginica*.

Se ha documentado que los microorganismos con acción probiótica como los actinomicetos marinos tienen la capacidad de mejorar la conversión alimenticia, la absorción y utilización de micronutrientes, así como la producción de ácidos grasos y vitaminas en una gran variedad de especies marinas cultivadas (Hai, 2015; Verschuere *et al.*, 2000; Vine *et al.*, 2006; Duan *et al.*, 2018; Mazón-Suástegui *et al.*, 2020). Al respecto, durante el desarrollo de la presente investigación se observó que los organismos del tratamiento T1 (formulado con la cepa RL8 del actinomiceto marino *Streptomyces sp.*) presentaron la mayor altura de los túbulos digestivos.

Por otra parte, mejorar la respuesta inmune es una meta fundamental en acuicultura, ya que la

presencia de un patógeno puede causar pérdidas económicas y daños socio-ecológicos. Algunos estudios realizados con CBAD en camarón Blanco *P. vannamei* se han enfocado a incrementar la resistencia de juveniles ante un potencial ataque de patógenos, con resultados positivos asociados a la aplicación profiláctica (preventiva) de CBAD. Los juveniles así tratados presentaron una mayor supervivencia y actividad enzimática SOD, al ser posteriormente retados con la cepa bacteriana virulenta de *V. parahaemolyticus* (Mazón-Suástegui *et al.*, 2018). En juveniles de almeja Catarina *A. ventricosus* se ha observado que con la aplicación profiláctica de CBAD se obtienen mejores resultados en supervivencia y crecimiento, en comparación con la administración profiláctica de antibióticos (Mazón-Suástegui *et al.*, 2017). En otro estudio se reporta un incremento en la respuesta inmune de juveniles de esta misma especie al observarse un mayor conteo de hemocitos en glándula digestiva, incrementos en la actividad de la enzima catalasa (CAT) en manto y actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en branquia, en las reservas energéticas de musculo, manto y glándula digestiva, además de una acción inmunomoduladora mediante la activación de genes asociados al reconocimiento de lo no-propio y endocitosis (López-Carvallo *et al.*, 2020).

Los resultados de la presente investigación indicaron que los organismos del tratamiento T1 presentaron el mayor conteo de hemocitos acompañado con el mayor nivel de expresión del gen Lectina tipo C (LEC) en glándula digestiva y manto. Las lectinas en moluscos bivalvos como *C. virginica* tienen funciones asociadas a procesos de autodefensa, parasitismo, simbiosis, reproducción, selección de partículas de alimento e inmovilización de microorganismos a través de aglutinación y encapsulamiento (Koizumi *et al.*, 1999; Kenio *et al.*, 2001; Nyholm *et al.*, 2004; Hager *et al.*, 2008; Springer *et al.*, 2008; Pales-Espinosa *et al.*, 2009). La expresión de la lectina tipo C también ha sido asociada con la función digestiva y de absorción de nutrientes que desempeña la glándula digestiva y en la capacidad de defensa de los organismos por medio del moco que rodea la cavidad digestiva (Pales-Espinosa *et al.*, 2009). La abundancia de lectinas en los tejidos paliales, está regulada en moluscos bivalvos como los ostreidos, por su maquinaria biológica y se asocia con sus demandas fisiológicas (Pales y Allam, 2013). De igual manera se ha hipotetizado la presencia de diferentes isoformas de lectinas en moluscos bivalvos que pueden proporcionarles una diversidad funcional para la respuesta inmunitaria (Song *et al.*, 2010). Jing

et al. (2011), identificaron las lectinas CvML3912 y CvML3914, asociadas a la respuesta inmune y captación de alimentos con altos valores nutrimentales para *C. virginica*, concluyendo que la disponibilidad de alimento, inanición y retos infecciosos, son factores que aumentan la densidad de la lectina CvML3912 demostrando a su vez que la lectina posee diferentes roles en la mucosa de los órganos paliales como la glándula digestiva, y que su expresión no solo se asocia a la respuesta inmune. Esto permite asociar al tratamiento T1 con la modulación de la respuesta inmune en reproductores de *C. virginica* acompañado con un incremento en la condición reproductiva de los organismos (Jing *et al.*, 2011; Pales y Allam, 2013; Pales-Espinosa *et al.*, 2018).

En relación con el tratamiento T5 diseñado para evaluar la sinergia CBAD+ACTIN (PhA 6C+SiT 6C + RL8), se observó una marcada elevación en los niveles de expresión del gen LEC en las branquias. Asimismo, se registraron niveles significativamente altos de expresión del gen Glutathion S-transferasa (GSTO) en las branquias de los organismos sometidos al tratamiento T4, que también fue formulado con el propósito de evaluar el efecto sinérgico CBAD-ACTIN (ViP 6C+ ViA 6C + RL8). Al respecto, la expresión del gen Glutathion S-transferasa asociado a la respuesta inmune, ya que su activación se asocia a en situaciones de estrés oxidativo (Nuseti *et al.*, 2004), por lo cual, se puede establecer que la aplicación individual de ACTIN (tratamiento T1) y/o la sinergia CBAD+ACTIN (tratamientos T4 y T5) pueden generar por igual un efecto benéfico significativo en la respuesta inmune en reproductores de *C. virginica*. Esto permite sugerir que los tratamientos ACTIN y CBAD utilizados en la presente investigación tienen potencial de ser utilizados para favorecer la maduración gonádica de reproductores de *C. virginica*, tanto por su actividad inmunomodulatoria como por el incremento de la condición general de los reproductores acondicionados, que se asocia con un mayor desarrollo gonádico y calidad ovocitaria.

9. CONCLUSIONES

Con base a los resultados derivados de la presente investigación, la hipótesis planteada sobre los efectos de la aplicación profiláctica de CBAD y ACTIN en el stock de reproductores de ostión americano *C. virginica* acondicionados para su maduración sexual en un laboratorio ostrícola comercial, como el Centro Ostrícola Tecnológico de Tabasco (COTET), puede ser aceptada.

1. La aplicación individual de ACTIN (T1= Cepa RL8 del actinomiceto marino *Streptomyces sp.*) generó un efecto positivo en la condición gonádica y modulación de la respuesta inmune de los adultos reproductores de *C. virginica*
2. La aplicación profiláctica CBAD+ACTIN en sinergia [T4= Lisados bacterianos de cepas patógenas ViA6C (*Vibrio alginolyticus*) + ViP 6C (*Vibrio parahaemolyticus*) + RL8] mejora la condición gonádica (gametogénesis/vitelogénesis), fisiológica y nutricional, así como la modulación de la respuesta inmune, en reproductores de *C. virginica*.
3. La aplicación en sinergia de CBAD+ACTIN [T5= PhA (*Phosphoricum acid*, Similia®, MX) + SiT (*Silicea terra*, Similia®, MX) + RL8] puede activar mecanismos de reconocimiento de hormonas esteroideas y modula la respuesta inmune, reproductores de *C. virginica*.

En función de los resultados obtenidos se sugiere continuar las investigaciones para profundizar la evaluación del efecto individual y sinérgico CBAD+ACTIN, en el desempeño reproductivo (número de gametos, huevos, porcentaje de fertilización, etc.) y en la progenie de *C. virginica*.

10. LITERATURA CITADA

- Abasolo-Pacheco, F., Bonilla-Montalván, B., Bermeo-Toledo, C., Ferrer-Sánchez, Y., Ramírez-Castillo, A.J., Mesa-Zavala, E. y Mazón-Suástegui, J.M. (2020). Efecto de medicamentos homeopáticos en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*). *Terra Latinoamericana*, 38(1): 217-231.
- Abdelrahman, H., ElHady, M., Alcivar-Warren, A., Allen, S., Al-Tobasei, R., Bao, L. y Zhou, T. (2017). Aquaculture genomics, genetics and breeding in the United States: current status, challenges, and priorities for future research. *BMC genomics*, 18(1): 1-23.
- Adel, M., Yeganeh, S., Dawood, M.A.O., Safari, R. y Radhakrishnan, S. (2017). Effects of *Pediococcus pentosaceus* supplementation on growth performance, intestinal microflora and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, 23(6): 1401-1409.
- Allam, B., Pales-Espinosa, E., Tanguy, A., Jeffroy, F., Le Bris, C. y Paillard, C. (2014). Transcriptional changes in Manila clam *Ruditapes philippinarum* in response to brown ring disease. *Fish & Shellfish Immunology*, 41(1): 2-11.
- Allam, B., y Pales-Espinosa, E. (2015). Mucosal immunity in mollusks. In *Mucosal Health in Aquaculture*, Academic Press, Alabama, pp 325-370.
- Allam, S., Allam, B. y Pales-Espinosa, E. (2021). Regulation of mucosal lectins in the oyster *Crassostrea virginica* in response to food availability and environmental factors. *Journal of Molluscan Studies*, 87(1): 0-37. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyaa037>
- Amoah, K., Huang, Q. C., Dong, X. H., Tan, B. P., Zhang, S., Chi, S. Y. y Yang, Y. Z. (2020). *Paenibacillus polymyxa* improves the growth, immune and antioxidant activity, intestinal health, and disease resistance in *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*, 518(73): 45-63.
- Arcos-Ortega, G.F, Ibarra, A. M. y Racotta, L. S. (2011) Vitellogenin in hemolymph predicts gonad maturity in adult female *Litopenaeus (Penaeus) vannamei* shrimp. *Aquaculture*, 316(4): 93-98.
- Arcos-Ortega, G.F., Ibarra, A.M., Rodríguez-Jaramillo, M.C., García-Latorre, E.A. y Vázquez-Boucard, C. (2009). Quantification of vitellin/vitellogenin-like protein in the oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein 1951) as a tool to predict the degree of gonad maturity. *Aquaculture Research*, 40(6): 644-655.
- Arcos-Ortega, G.F., Serrano-Silvas, S.R., Rodríguez-Jaramillo, M. C., Acuna-Gómez, E.P., Schofield- Astorga, D.C. y Olave-Solar, C.D. (2019). Oogenesis of *Lithodes santolla*: histological and histochemical characterization. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 47(3): 480-491.
- Ariadi, H., Fadjar, M. y Mahmudi, M. (2019). The relationships between water quality parameters and the growth rate of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in intensive ponds. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation*, 12(6): 2103-2116.
- Arias de León, C. (2014). La pesquería mexicana del ostión *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) Del Golfo de México: limitantes de su desarrollo. *Tesis Doctoral*. Universidad Veracruzana, Instituto de Ciencias Marinas y Pesquerías, Boca del Río.
- Ascencio, L.A., Enriquez, M., Martínez, I. y Aldana, D. (2014). Variación del ciclo gonádico del ostión americano, *Crassostrea virginica* (Ostreoida: Ostreidae) en función de su talla en la laguna de Tamiahua, Veracruz, México. *Revista de Biología Tropical*, 62(1): 367-372.

- Ascencio, L.A., Enríquez, M., Martínez, I. y Aldana, D. (2016). Efecto de la temperatura y la salinidad en el ciclo reproductor de hembras y machos de *Crassostrea virginica* (Bivalvia: Ostreidae). *Revista de Biología Tropical*, 64(2): 449-459.
- Avilés-Quevedo, S. y Vázquez-Hurtado, M. (2006). Fortalezas y debilidades de la acuicultura en México. *Pesca acuicultura e investigación en México*. Comisión de pesca, México DF, pp 69-86.
- Badillo-Zapata, D., Zaragoza, F.D.J., Vega-Villasante, F., López-Huerta, J.M., Herrera-Resendiz, S., Cueto-Cortés, L. y Guerrero-Galvan, S.R. (2018). Requerimiento de proteína y lípidos para el crecimiento de juveniles del pez nativo *Dormitator latifrons* (Richardson, 1844). *Ecosistemas y recursos Agropecuarios*, 5(14): 345-351.
- Baqueiro-Cárdenas, E.R., Aldana-Aldana, D., Sevilla, M.L. y Rodríguez-Espinosa, P.F. (2007). Variations in the reproductive cycle of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791), Pueblo Viejo lagoon, Veracruz, México. *Transitional Waters Bulletin*, 1(2): 37-46
- Bayne, B.L. (1976). Aspects of reproduction in bivalve mollusks. *Estuarines processes uses, stresses, and adaptation to the estuary*. Academic press, Alabama, pp. 432-448.
- Bell, I.R. y Schwartz, G.E. (2015). Enhancement of adaptive biological effects by nanotechnology preparation methods in homeopathic medicines. *Homeopathy*, 104(2): 123-138. doi: 10.1016/j.homp.2014.11.003.
- Bellavite, P., Conforti, A., Pontarollo, F. y Ortolani, R. (2006). Immunology and homeopathy. 2. Cells of the immune system and inflammation. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 3(1): 13-24.
- Bellavite, P., Marzotto, M., Oliosio, D., Moratti, E. y Conforti, A. (2014a). High-dilution effects revisited. 1. Physicochemical aspects. *Homeopathy*, 103(1): 4-21.
- Bellavite, P., Marzotto, M., Oliosio, D., Moratti, E. y Conforti, A. (2014b). High-dilution effects revisited. 2. Pharmacodynamic mechanisms. *Homeopathy*, 103(1) :22-43.
- Berthelin, C., Kellner, K. y Mathieu, M. (2000a). Histological characterization and glucose incorporation into glycogen of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* storage cells. *Marine Biotechnology*, 2(1): 136-145.
- Betanzos-Vega, A., Lodeiros, C., Espinosa-Sáez, J. y Mazón-Suástegui, J.M. (2016). Identificación del ostión americano *Crassostrea virginica* (Mollusca: Bivalvia: Ostreidae) como recurso natural en las Antillas Mayores: Cuba. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87(4): 1342-1347.
- Blanchard, J.L., Watson, R.A., Fulton, E.A., Cottrell, R.S., Nash, K.L., Bryndum-Buchholz, A. y Jennings, S. (2017). Linked sustainability challenges and trade-offs among fisheries, aquaculture and agriculture. *Nature Ecology & Evolution*, 1(9): 1240-1249.
- Brechtbuehl, K., Whalley, S.A., Dusheiko, G.M. y Saunders, N.A. (2001). A rapid realtime quantitative polymerase chain reaction for hepatitis B virus. *Journal of Virological Methods*, 93(1): 105-113.
- Burreson, E.M y Ford, S.E. (2002). A review of recent information on the Haplosporidia, with special reference to *Haplosporidium nelsoni* (MSX disease). *Aquatic Living Resources*, 17(1): 499-517.
- Callam, B.R., Allen, S.K. y Frank, L.A. (2016). Genetic and environmental influence on triploid *Crassostrea virginica* grown in Chesapeake Bay: growth. *Aquaculture*, 452(1): 97-106.
- Campa-Córdova, A.I., Luna-González, A., Mazón-Suástegui, J.M., Aguirre-Guzmán, G., Ascencio, F. y González-Ocampo, H.A. (2011). Effect of probiotic bacteria on survival and growth of Cortez oyster larvae, *Crassostrea corteziensis* (Bivalvia:Ostreidae). *Revista de Biología*

Tropical, 59(1): 183–191.

- Caracciolo, G. (2015). Liposome protein corona in a physiological environment: challenges and opportunities for targeted delivery of nanomedicines. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 11(3): 543-557.
- Carrera, S.C. (2018). Efecto de la salinidad y calidad del silicato sobre el crecimiento de la diatomea *Chaetoceros calcitrans*. *Revista de Investigaciones Agroempresariales*, 5(1): 1-5.
- Cataliotti, R.S., Aliotta, F. y Ponterio, R. (2009). Silver nanoparticles behave as hydrophobic solutes towards the liquid water structure in the interaction shell. A Raman study in the O–H stretching region. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 11(47): 11258-11263.
- Chávez-Villalba, J. (2014). Cultivo de ostión *Crassostrea gigas*: Análisis de 40 años de actividades en México. *Hidrobiológica*, 24(3): 175-190.
- Chávez-Villalba, J., Hernández-Ibarra, A., López-Tapia, M.R., Mazón-Suástegui, J.M. (2008). Prospective culture of the Cortez oyster *Crassostrea corteziensis* from Northwestern Mexico: growth, gametogenic activity, and condition index. *Journal of Shellfish Research*, 27(4): 711-720.
- Chen, J., Yu, Z., Chen, H., Gao, J., Liang, W. (2011). Transfection efficiency and intracellular fate of polycation liposomes combined with protamine. *Biomaterials*, 32(5): 1412-1418.
- Chong, R.S.M. (2022). Endocrine disruption in mollusks. In *Aquaculture Pathophysiology*. Academic Press, Alabama, pp. 631-638.
- Clements, J.C., Carver, C.E., Mallet, M.A., Comeau, L.A., Mallet, A.L. (2021). CO₂-induced low pH in an eastern oyster (*Crassostrea virginica*) hatchery positively affects reproductive development and larval survival but negatively affects larval shape and size, with no intergenerational linkages. *ICES Journal of Marine Science*, 78(1):349-359.
- CONAPESCA. (2019). Anuario Estadístico 2012. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Disponible en: http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario_2019_zip [consultado: 15 agosto 2023].
- CONAPESCA. (2012). Anuario Estadístico 2012. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Disponible en: http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario_2012_zip [consultado: 15 agosto 2023].
- Cornejo, R.A., Serrato, D.A., Rendón, A.B., Rocha, M.M.G. (2014). PCR en tiempo real. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. SEMARNAT-INECC, México, D.F, pp. 175-201.
- COSAP. (2015). Proyecto: moluscos bivalvos. *Comité de Sanidad Acuícola y Pesquero Veracruzano A.C. REG. NO. 24/SENASICA/DGSA/VER/05-2015*. SENASICA, Veracruz, Ver, pp. 35-81.
- Das, S., Ward L.R. y Burke C. (2010). Screening of marine *Streptomyces spp.* for potential use as probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 305(1): 32–41.
- De Oliveira, F.K.C., Aparecido J.P. y Sampaio, D.A.J. (2013). Physiological responses of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) treated with homeopathic product and submitted to transport stress. *Homeopathy*, 102(1): 268-273.
- Delmare Gourmet. (2023) *Delmare gourmet, mariscos y moluscos, ostiones (México)*. Disponible en: <https://www.delmare.com.mx/mariscos-y-moluscos/ostion>[consultado: 21 agosto 2023].
- Denny, M.W. (1989). Invertebrate mucus secretions: functional alternatives to vertebrate paradigms. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 43(1): 337-366.

- Dharmaraj, S. (2011). Antagonistic potential of marine actinobacteria against fish and shellfish pathogens. *Turkish Journal of Biology*, 35(3): 303-311.
- Dharmaraj, S. y Dhevendaran, K. (2010). Evaluation of *Streptomyces* as a probiotic feed for the growth of ornamental fish *Xiphophorus helleri*. *Food technology and Biotechnology*, 48(4): 497-504.
- Donahue, N.D., Acar, H. y Wilhelm, S. (2019). Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 143(1): 68-96.
- Dridi, S., Salah, M. y Elcafsi, M. (2007). Seasonal variation in weight and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in relation to the gametogenic cycle and environmental conditions of the Bizert lagoon, Tunisia. *Aquaculture*, 263(2): 238–248.
- Duan, Y., Wang, Y., Dong, H., Ding, X., Liu, Q., Li, H. y Xiong, D. (2018). Changes in the intestine microbial, digestive, and immune-related genes of *Litopenaeus vannamei* in response to dietary probiotic *Clostridium butyricum* supplementation. *Frontiers in Microbiology*, 9(1): 2191-2199.
- Eckelbarger, K.J. y Davis, C.V. (1996). Ultrastructure of the gonad and gametogenesis in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Ovary and oogenesis. *Marine Biology*, 127(1): 79-87.
- Elston, R.A., Hasegawa, H., Humphrey, K.L., Polyak, I.K. y Hase, C.C. (2008). Re-emergence of *Vibrio tubiashii* in bivalve shellfish aquaculture: severity, environmental drivers, geographic extent and management. *Diseases of Aquatic Organisms*, 82(2): 119-134.
- Escoubas, J.M., Gourbal, B., Duval, D., Green, T., Charrière, G., Destoumieux, G.D. y Montagnani, C. (2016) Immunity in molluscs. *Encyclopedia of Immunobiology*, Elsevier Ltd, Ámsterdam, pp.417-436.
- Espinosa, E.P., Corre, E. y Allam, B. (2014). Pallial mucus of the oyster *Crassostrea virginica* regulates the expression of putative virulence genes of its pathogen *Perkinsus marinus*. *International Journal for Parasitology*, 44(5): 305-317.
- Ezgeta, B.D., Radonic, I., Bojanic, V.D., Zorica, B., Arapov, J., Staglicic, N. y Segvic B.T. (2020). Reproductive cycle of a non-native oyster, *Crassostrea gigas*, in the Adriatic Sea. *Mediterranean Marine Science*, 21(1): 146-156.
- Fabioux, C., Huvet, A.P., Le Souchu, M., Le Pennec, S. y Pouvreau, S. (2005). Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture*, 250(2): 458–470.
- Fabioux, C., Pouvreau, S., Le Roux, F., Huvet, A. (2004a). The oyster vasa-like gene: a specific marker of the germline in *Crassostrea gigas*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 315(4): 897-904.
- Faisal, M. y Kim, Y. (2018). A review of the use of probiotics for health management of farmed oysters and other bivalves. *Reviews in Aquaculture*, 10(4): 951-964.
- FAO. (2023). *Crassostrea virginica*. Programa de información de especies acuáticas. Texto de Kennedy, V. S. División de Pesca y Acuicultura [en línea]. Roma. Actualizado 2006-07-04 [Citado Friday, March 10th 2023]. Disponible en: https://www.fao.org/fishery/es/culturedspecies/crassostrea_virginica_es/es [consultado: 15 agosto 2023].
- Fdhila, K., Haddaji, N., Chakroun, I., Dhiaf, A., Macherki, M.E.E., Khouildi, B. y Missaoui, H. (2017). Culture conditions improvement of *Crassostrea gigas* using a potential probiotic *Bacillus sp.* strain. *Microbial Pathogenesis*, 110(1): 654-658.

- Fernández-González, L.E., Sánchez-Marín, P., Gestal, C., Beiras, R. y Díaz, A.P. (2021). Vitellogenin gene expression in marine mussels exposed to ethinylestradiol: No induction at the transcriptional level. *Marine Environmental Research*, 168(1): 105-115.
- Fiorito, F., Di Concilio, D., Lambiase, S., Amoroso, M.G., Langellotti, A.L., Martello, A. y Fusco, G. (2021). Oyster *Crassostrea gigas*, a good model for correlating viral and chemical contamination in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 172(1): 112-125.
- Floreto, E.A.T., Brown, P.B. y Bayer, R.C. (2001). The effects of krill hydrolysate-supplemented soya-bean based diets on the growth, colouration, amino and fatty acid profiles of juvenile american lobster, *Homarus americanus*. *Aquaculture Nutrition*, 7(1): 33-43.
- Ford, S.E. y Borrero, F.J. (2001). Epizootiology and pathology of juvenile oyster disease in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 78(3): 141-154.
- Gabbott, P.A. y Peek, K. (1991). Cellular biochemistry of the mantle tissue of the mussel *Mytilus edulis*. *Aquaculture*, 94(1): 165-176.
- García-Bernal, M., Campa-Córdova, Á.I., Saucedo, P.E., González, M.C., Marrero, R.M. y Mazón-Suástegui, J.M. (2015). Isolation and in vitro selection of actinomycetes strains as potential probiotics for aquaculture. *Veterinary World*, 8(2): 170-176.
- García-Bernal, M., Marrero, R.M., Campa-Córdova, Á.I. y Mazón-Suástegui, J.M. (2017). Probiotic effect of *Streptomyces* strains alone or in combination with *Bacillus* and *Lactobacillus* in juveniles of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture International*, 25(1): 927-939.
- García-Bernal, M., Marrero, R.M., Campa-Córdova, Á.I. y Mazón-Suástegui, J.M. (2017) Probiotic effect of *Streptomyces* strains alone or in combination with *Bacillus* and *Lactobacillus* in juveniles of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture International*, 25(1): 927-939.
- García-Bernal, M., Medina, M.R., Rodríguez-Jaramillo, C., Marrero, C.O., Campa-Córdova, Á.I., Medina, G.R. y Mazón-Suástegui, J.M. (2018). Probiotic effect of *Streptomyces spp.* on shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture Nutrition*, 24(2): 865-871.
- García-Bernal, M., Medina-Marrero, R., Saucedo, P.E., Campa-Córdova, A.I. y Mazón-Suástegui, J.M. (2019). Growth and antioxidant response of juvenile oysters *Crassostrea sikamea* and *Crassostrea corteziensis* treated with *Streptomyces* strains. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 71(6): 1993-1998.
- García-Corona, J.L. (2018). *Análisis fisiológico y transcriptómico del efecto de medicamentos homeopáticos en la maduración gonádica del mejillón café Modiolus capax (Conrad, 1837). Tesis de Maestría.* Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., La Paz, B.C.S.
- García-Corona, J.L., Hégaret, H., Deléglise, M., Marzari, A., Rodríguez-Jaramillo, C., Foulon, V. y Fabioux, C. (2022). First subcellular localization of the amnesic shellfish toxin, domoic acid, in bivalve tissues: Deciphering the physiological mechanisms involved in its long-retention in the king scallop *Pecten maximus*. *Harmful Algae*, 116(1): 102-115.
- García-Cubas, A. y Reguero, M. (2007). Catálogo ilustrado de moluscos bivalvos del Golfo de México y Mar Caribe: obra póstuma (ii) del Dr. Antonio García-Cubas. Estudios sobre la Malacología y Conquiología en México. Universidad Autónoma de Guadalajara, Zapopan, pp. 61-65.
- Gómez-Robles, E., Mazón-Suástegui, J.M., Acosta, H.S., Hawkyns, M.M. y Saucedo, P.E. (2013). Internal nutrient management associated with gonad quality and successful reproduction in

- the winged pearl oyster *Pteria sterna*. *Aquaculture*, 45(51): 412-418.
- Gomez-Robles, E., Rodriguez-Jaramillo, C. y Saucedo, P. E. (2005). Digital image analysis of lipid and protein histochemical markers for measuring oocyte development and quality in pearl oyster *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856). *Journal of Shellfish Research*, 24(4): 1197-1202.
- Gongora-Gómez, A.M., Sepúlveda, C.H., Verdugo, E.H.A., Astorga, C.O., Rodríguez, G.H., Domínguez, O.A.L. y García, U.M. (2020). Gonadal maturity of *Crassostrea corteziensis* cultivated in the Gulf of California. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 48(3): 381-395.
- Grabowski, J.H., Powers, S.P., Peterson, C.H., Powers, M.J. y Green, D.P. (2003). Consumer ratings of non-native (*Crassostrea gigas* and *Crassostrea ariakensis*) vs. native (*Crassostrea virginica*) oysters. *Journal of Shellfish Research*, 22(1): 21-30.
- Gutiérrez, M.F.P., Romero, G.A.J., Barros, A.D. y Ruiz, J.R. (2017). Cultivo de microalgas *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis sp.* para alimentación de larvas de peces marinos. *Revista Mutis*, 7(2): 75-80.
- Guzmán-García, X., Botello, A.V., Martínez-Tabche, L. y González-Márquez, H. (2009). Effects of heavy metals on the oyster (*Crassostrea virginica*) at Mandinga Lagoon, Veracruz, Mexico. *Revista de Biología Tropical*, 57(4): 955-962.
- Hager, K.M. y Carruthers, V.B. (2008). Marveling at parasite invasion. *Trends Parasitology*, 24(1): 51-64.
- Hai, N.V. (2015). The use of probiotics in aquaculture. *Journal of Applied Microbiology*, 119(4): 917-935.
- Harding, J.M. (2007). Comparison of growth rates between diploid deby eastern oysters (*Crassostrea virginica*, Gmelin 1791), triploid eastern oysters, and triploid Suminoe oysters (*C. ariakensis*, Fugita 1913). *Journal of Shellfish Research*, 26(4): 961-972.
- He, B., Kempainen, J.A., Voegel, J.J., Gronemeyer, H. y Wilson, E.M. (1999). Activation function 2 in the human androgen receptor ligand binding domain mediates interdomain communication with the NH2-terminal domain. *Journal of Biological Chemistry*, 274(52): 37219-37225.
- Hoo, C.M., Starostin, N., West, P. y Mecartney, M.L. (2008). A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. *Journal of Nanoparticle Research*, 10(1): 89-96.
- Hühn, J. C., Carrillo, C.M.G., Soliman, C., Pfeiffer, D., Váldez-Pérez, A., Masood, I., Chakraborty, L., Zhu, M., Gallego, Z., Yue, M., Carril, N., Feliu, A., Escudero, A.M., Alkilany, B., Pelaz, P. y Del Pino, W.J. (2017). Selected standard protocols for the synthesis, phase transfer, and characterization of inorganic colloidal nanoparticles. *Chemistry of Materials*, 29(1): 399-461.
- Ijiri, S., Tsukamoto, K., Chow, S., Kurogi, H., Adachi, S. y Tanaka, H. (2011). Controlled reproduction in the Japanese (*Anguilla japonica*), past and present. *Aquaculture Europe*, 36(2): 13-17.
- Ikenowe H. y T. Kafuku, (1992). *Modern methods of aquaculture in Japan. Development in Aquaculture and Fisheries Science*. Elsevier, Ámsterdam.
- INAPESCA. (2016). Acuacultura ostión del este. Disponible en: <https://www.gob.mx/inapesca/acciones-y-programas/acuacultura-ostion-del-este> [consultada: 17 agosto 2023].
- INAPESCA. (2021). Acuacultura ostión del este. Disponible en: <https://www.gob.mx/inapesca/acciones-y-programas/acuacultura-ostion-del-este> [consulta:

17 agosto 2023].

- Itoh, N. y Takahashi, K.G. (2008). Distribution of multiple peptidoglycan recognition proteins in the tissues of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 150(4): 409-417.
- Itoh, N., Xue, Q., Li, Y., Cooper, R.K. y Peyre, J.F. (2007). cDNA cloning and tissue expression of plasma lysozyme in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Fish & Shellfish Immunology*, 23(5): 957-968.
- Janeway, C. A. (1994). The role of microbial pattern recognition in self: nonself discrimination in innate and adaptive immunity. *Phylogenetic perspectives in immunity, the insect host defence*, 1(1): 115-122.
- Jing, X., Pales-Espinosa, E., Perrigault, M. y Allam, B. (2011). Identification, molecular characterization and expression analysis of a mucosal C-type lectin in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Fish & Shellfish Immunology*, 30(3): 851-858.
- Junior, P. y Felix, V. (2017). *Extrato etanólico na alimentação do pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887): efeitos sobre o desempenho e morfologia intestinal*. Bachelor's thesis, Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
- Kang, C.K., Park, M.S., Lee, P.Y., Choi, W.J. y Lee, W.C. (2000). Seasonal variation in condition, reproductive activity, and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) in suspended culture in two coastal bays of Korea. *Journal of Shellfish Research*, 19(2): 771-778.
- Karim, M., Zhao, W., Rowley, D., Nelson, D. y Gomez-Chiarri, M. (2013). Probiotic strains for shellfish aquaculture: protection of eastern oyster, *Crassostrea virginica*, larvae and juveniles against bacterial challenge. *Journal of Shellfish Research*, 32(2): 401-408.
- Ke, P.C., Lin, S., Wolfgang, J., Parak, T.P. y Davis, F.C. (2017). A Decade of the Protein Corona. *ACS Nano*, 11(12): 11773–11776.
- Kenjo, A., Takahashi, M., Matsushita, M., Endo, Y., Nakata, M., Mizuochi, T. y Fujita, T. (2001). Cloning and characterization of novel ficolins from the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(23): 19959-19965.
- Kennedy, V.S. y Sanford, L.P. (1999). *Characteristics of relatively unexploited beds of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and early restoration programs*. *Oyster reef habitat restoration: A synopsis and synthesis of approaches*. Virginia Institute of Marine Science Press, Richmond Virginia USA, pp. 25-46.
- Kett, G.F., Culloty, S.C., Jansen, M.A. y Lynch, S.A. (2022). Development of a sensitive polymerase chain reaction (PCR) and digoxigenin (DIG)-labeled in situ hybridization (ISH) for the detection of *Vibrio* bacteria in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture Reports*, 22(1): 954-961.
- Kim, D. H., y Austin, B. (2006). Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. *Fish & Shellfish Immunology*, 21(5): 513-524.
- Kim, E. y Yeom, M.S. (2014). Structural arrangement of water molecules around highly charged nanoparticles: Molecular Dynamics Simulation. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 35(5): 1501-1505.
- Kimmel, D.G. y Newell, R.I. (2007). The influence of climate variation on eastern oyster (*Crassostrea virginica*) juvenile abundance in Chesapeake Bay. *Limnology and Oceanography*, 52(3): 959-965.

- Koizumi, N., Imai, Y., Morozumi, A., Imamura, M., Kadotani, T., Yaoi, K. y Sato, R. (1999). Lipopolysaccharide-binding protein of *Bombyx mori* participates in a hemocyte-mediated defense reaction against gram-negative bacteria. *Journal of Insect Physiology*, 45(9): 853-859.
- Konovalov, A.I., Maltseva, E.L., Ryzhkina, I.S., Murtazina, L.I., Kiseleva, Y.V., Kasparov, V.V. y Palmina, N.P. (2014). Formation of nanoassociates is a factor determining physicochemical and biological properties of highly diluted aqueous solutions. *Doklady Physical Chemistry*, 456(1): 86-89.
- L. y Barajas, P.U. (2020). Preengorda de semillas de ostra americana *Crassostrea virginica* con aplicación de actinomicetos probióticos y medicamentos homeopáticos. *AquaTechnica: Revista Iberoamericana de Acuicultura.*, 2(3): 150-160.
- Lavaud, R., La Peyre, M.K., Casas, S.M., Bacher, C. y La Peyre, J.F. (2017). Integrating the effects of salinity on the physiology of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, in the northern Gulf of Mexico through a Dynamic Energy Budget model. *Ecological Modelling*, 363(1): 221-233.
- Lawale, A., Allen, S.K. y Dégremont, L. (2014). Breeding and domestication of eastern oyster (*Crassostrea virginica*) lines for culture in the mid-Atlantic, USA: line development and mass selection for disease resistance. *Journal of Shellfish Research*, 33(1): 153-165.
- Levene, H. (1960). In *Contributions to Probability and Statistics: Essays in Honor of Harold Hotelling*. Stanford University Press, Stanford, pp. 278-292.
- Li, Q. I., Osada, M., Suzuki, T. y Mori, K. (1998). Changes in vitellin during oogenesis and effect of estradiol-17 β on vitellogenesis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Invertebrate Reproduction & Development*, 33(1): 87-93.
- Li, X.X. y Stark, G.R. (2002). NF kappa B-dependent signaling pathways. *Experimental Hematology*, 30(1): 54-62.
- Liao, I.C., y Huang, Y.S. (2000). Methodological approach used for the domestication of potential candidates for aquaculture. *Cahiers Options Méditerranéennes*, 47(1) 97-107.
- Lilliefors, H. (1967). On the Kolmogorov-Smirnov test for normality with mean and variance unknown. *Journal American Statistic Association*, 62(318): 399-402.
- Lim, H. J., Lim, J. S., Lee, J. S., Choi, B. S., Kim, D. I., Kim, H. W. y Choi, I. Y. (2016). Transcriptome profiling of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* by Illumina RNA-seq. *Genes & Genomics*, 38(4): 359-365. <https://doi.org/10.1007/s13258-015-0376-0>
- Lin, H., Chen, X.S., Chen, S., Li, Z., Huang, Z., Niu, J., Wu, K. y Lu, X. (2011). Replacement of fish meal with fermented soybean meal in practical diets for pompano *Trachinotus ovatus*. *Aquaculture Research*, 44(1): 151-156. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.03000.x>
- Liu, W., Li, Q., Yuan, Y. y Zhang, S. (2008). Seasonal variations in reproductive activity and biochemical composition of the cockle *Fulvia mutica* (Reeve) from the eastern coast of China. *Journal of Shellfish Research*, 27(2): 405-411.
- Liu, X., Li, L., Li, A., Li, Y., Wang, W. y Zhang, G. (2019) Transcriptome and gene coexpression network analyses of two wild populations provides insight into the high-salinity adaptation mechanisms of *Crassostrea ariakensis*. *Marine Biotechnology*, 21(5): 596-612.
- Loker, E.S. (2010). Gastropod immunobiology. *Advanced Experimental Medical Biology*, 708(1): 17-43.
- López-Carvalho, J.A., Arcos-Ortega, G.F., Tovar, R.D., Hernández, O.M.Á., Abasolo-Pacheco, F., García-Corona, J.L. y Mazón-Suástegui, J.M. (2019.) Effect of immunomodulatory medication over the general response of juvenile Catarina scallop (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842). *Latin American Journal of Aquatic Research*, 47(1): 65-77.

- López-Carvalho, J.A., Mazón-Suástegui, J.M., Arcos-Ortega, G.F., Hernández, O.M. Á., Tovar, R.D., Abasolo-Pacheco, F. y García-Bernal, M. (2022). Highly diluted bioactive compounds in marine aquaculture: A potential alternative for sustainable production. *Reviews in Aquaculture*, 14(3): 1170-1193.
- López-Carvalho, J.A., Mazón-Suástegui, J.M., Hernández, O.M.A., Tovar, R.D., Abasolo-Pacheco, F., Morelos, C.R.M. y Arcos-Ortega, G.F. (2020). Transcriptome analysis of Catarina scallop (*Argopecten ventricosus*) juveniles treated with highly-diluted immunomodulatory compounds reveals activation of non-self-recognition system. *Plos One*, 15(5): 233-245.
- López-Díaz, G., González, N.E., Hernández, V.Y.B., Alarcón, R.J.A., Luna, A.L. y Königsberg, A.M. (2013). Hormesis: lo que no mata, fortalece. *Gaceta Médica de México*, 149(4): 438-447.
- López-Elías, J.A., García, L.N., Jiménez, G.L.R. y Huerta, A.N. (2009). Crecimiento de la diatomea *Thalassiosira pseudonana* en cultivos estáticos con iluminación continua y fotoperiodo a diferentes salinidades. *Biotecnia*, 11(1): 11-18.
- Mackenzie Jr, C. L. (2007). Causes underlying the historical decline in eastern oyster (*Crassostrea virginica* Gmelin, 1791) landings. *Journal of Shellfish Research*, 26(4): 927-938.
- Mahmoudi, M., Bertrand, N., Zope, H. y Farokhzad, O. C. (2016). Emerging understanding of the protein corona at the nano-bio interfaces. *Nano Today*, 11(6): 817-832.
- Mann, R., Southworth, M., Carnegie, R. B. y Crockett, R. K. (2014). Temporal variation in fecundity and spawning in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, in the Piankatank River, Virginia. *Journal of Shellfish Research*, 33(1): 167-176.
- Mansfield, G.S., Desai, A.R., Nilson, S.A., Van-Kessel, A.G., Drew, M.D. y Hill, J.E. (2010). Characterization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestinal microbiota and inflammatory marker gene expression in a recirculating aquaculture system. *Aquaculture*, 307(2): 95-104.
- Mathieu, M. y Lubet, P. (1993). Storage tissue metabolism and reproduction in marine bivalves: a brief review. *Invertebrate Reproduction & Development*, 23(3): 123-129.
- Matsumoto, T., Nakamura, A.M., Mori, K. y Kayano, T. (2003). Molecular characterization of a cDNA encoding putative vitellogenin from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Zoological Science*, 20(1): 37-42.
- Matsumoto, T., Yamano, K., Kitamura, M. y Hara, A. (2008). Ovarian follicle cells are the site of vitellogenin synthesis in the Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A. Molecular & Integrative Physiology*, 149(3): 293-298.
- Matt, J.L., y Allen, J.S.K. (2021). A classification system for gonad development in triploid *Crassostrea virginica*. *Aquaculture*, 532(73): 59-74.
- Mazón Suástegui, J.M., García-Bernal, M., Abasolo-Pacheco, F., Campa-Córdoba, I., Medina, R.M. y Saucedo, P.E. (2015b). Homeopathy for shrimp aquaculture: Increased survival and superoxide dismutase activity in juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* during a bacterial pathogen-challenge. *Homeopathy*, 5(2): 08-16.
- Mazón-Suástegui J.M., García-Bernal, M., Avilés, Q.A., Campa-Córdoba, A.I., Salas, L.J. y Abasolo-Pacheco, F. (2018a). Assessment of homeopathic medicines on survival and antioxidant response in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Revista MVZ Córdoba*, 23(3): 6850-6859.
- Mazón-Suástegui J.M., Ojeda, S.C.M., García-Bernal, M., Avilés, Q.M.A., Abasolo-Pacheco, F., Batista, S.D., Tovar, R.D., Arcos-Ortega, F., Murillo, A.B., Nieto, G.A., Ferrer, S., Morelos, C.R.M., Alvarado, M.A., Díaz, D.M., Bonilla, M.B. (2019a). Agricultural homeopathy: New insights into organics. "Multifunctionality and Impacts of Organic and Conventional

- Agriculture". *IntechOpen Books*. IntechOpen, Rijeka, pp. 84-102.
- Mazón-Suástegui J.M., Robles, M.M., Ormart, C.P., Monsalvo, S.P., Garzón, F.J., Reynoso, G.T. y Moctezuma, C.T.A. (2008). Reproducción controlada de tres especies de concha negra *Anadara spp.* en el laboratorio. *2nd Encuentro Conchero*, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Leon, Nicaragua, pp. 1-16.
- Mazón-Suástegui, J. M., Parres, A.H., Ruíz, K.M.R., Rodríguez-Jaramillo, M.C. y Saucedo, P.E. (2009). Influence of hatchery diets on early grow-out of the Cortez oyster *Crassostrea corteziensis* in Sinaloa, Mexico. *Aquaculture Research*, 40(16): 1908–1914.
- Mazón-Suástegui, J.M, García-Bernal, M., Saucedo, P.E., Campa-Córdoba, A.I. y Abasolo-Pacheco, F. (2017). Homeopathy outperforms antibiotics treatment in juvenile scallop *Argopecten ventricosus*: Effects on growth, survival, and immune response. *Homeopathy*, 106(1): 18-26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.homp.2016.12.002>.
- Mazón-Suástegui, J.M. (1988). Acondicionamiento y desove de cuatro especies de Moluscos Bivalvos, alimentados con dietas artificiales. *Revista Latinoamericana de Acuicultura*, 38(3): 4-12.
- Mazón-Suástegui, J.M. (1996). Cultivo de ostión japonés. Estudio del potencial pesquero y acuícola de Baja California Sur. Semarnat, México DF, pp. 626-650.
- Mazón-Suástegui, J.M. (2005). *Biología y cultivo de la almeja catarina Argopecten ventricosus (Sowerby II, 1842)*. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona. España.
- Mazón-Suástegui, J.M. (2018). Bioecología y manejo acuícola-pesquero de moluscos del género *Crassostrea*: Caso ostión americano *C. Virginica* (Gmelin, 1791). *La ostricultura: una alternativa de desarrollo pesquero para comunidades costeras en Cuba*. Epomex, Campeche, pp. 25-41.
- Mazón-Suástegui, J.M., Abasolo-Pacheco, M.R., García-Bernal, A.I., Campa-Córdoba, P. y Saucedo, P.E. (2015a). Homeopathy for mollusk aquaculture: Increased growth, survival, and protection of juvenile Catarina scallop *Argopecten ventricosus* against bacterial 144 pathogen- challenge. *Homeopathy*, 2(1):15-24.
- Mazón-Suástegui, J.M., Avilés, M.A.Q., Vega, R., de La Vega, A., Rosero, G.D. y Tovar, R. (2015c). Homeopathy for marine fish aquaculture: Increased growth and survival of juvenile spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Homeopathy*, 3(2): 20-29.
- Mazón-Suástegui, J.M., Barajas, F.J.D., Moctezuma, C.T., Tizoc, A.P.O. (2011d). *Acondicionamiento gonádico, maduración y desove de reproductores y su evaluación histológica e histoquímica*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C, La Paz.
- Mazón-Suástegui, J.M., García-Bernal, M., Saucedo, P.E., Campa-Córdoba, A. y Abasolo-Pacheco, F. (2017). Homeopathy outperforms antibiotics treatment in juvenile scallop *Argopecten ventricosus*: effects on growth, survival, and immune response. *Homeopathy*, 106(1): 18-26.
- Mazón-Suástegui, J.M., López-Carvallo, J.A., Rodríguez-Jaramillo, M.C., García-Corona, J.L., Arcos-Ortega, G.F. y Abasolo-Pacheco, F. (2021). Ultra-diluted bioactive compounds enhance energy storage and oocyte quality during gonad conditioning of Pacific calico scallop *Argopecten ventricosus* (Sowerby II, 1842). *Aquaculture Research*, 52(4): 1490-1500.
- Mazón-Suástegui, J.M., Salas, L.J., Medina, M.R., Medina, G.R. y García-Bernal, M. (2019). Effect of *Streptomyces* probiotics on the gut microbiota of *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiology Open*, 3(1): 9-16.
- Mazón-Suástegui, J.M., Salas, L.J., Teles, A. y Tovar, R.D. (2019b). Immune and antioxidant enzyme response of Longfin yellowtail (*Seriola rivoliana*) juveniles to ultra-diluted substances

- derived from phosphorus, silica and pathogenic Vibrio. *Homeopathy*, 108(1): 43-53.
- Mazón-Suástegui, J.M., Tovar, R.D., Ortiz, C.N.L., García-Bernal, M., Salas, L.J.S. y Abasolo-Pacheco, F. (2019). Efecto de medicamentos homeopáticos sobre crecimiento, supervivencia y microbiota gastrointestinal, en juveniles del pectínido *Argopecten ventricosus*. *Revista MVZ Córdoba*, 24(3): 7328-7338.
- Mazón-Suástegui, J.M., Tovar-Ramírez, D., Salas-Leiva, J. S., Arcos-Ortega, G.F., García-Bernal, M., Avilés-Quevedo, M.A., López-Carvallo, J.A., García-Corona, J.L., Ibarra-García, L.E., Ortíz-Cornejo, N.L., Teles, A., Rosero-García, A., Abasolo-Pacheco, F., Campa-Córdova, A.I., Saucedo-Lastra, P.E., Barajas-Frías, J.D., Ormart-Castro, P., Rodríguez-Jaramillo, M.C., González-González, R., Barajas-Ponce, U., Tordecillas-Guillén, J.L., Álvarez-Gil, F.A., Pineda-Mahr, G., Peiro-López, J., Robles-Mungaray, M. (2018). Aquacultural homoeopathy: A focus on marine species. *IntechOpen Books*. IntechOpen, Rijeka, pp. 67-90.
- Mazón-Suástegui, J. M., Barajas, F.J.D., Moctezuma, C.T., Tizoc, A.P.O. (2011a). *Desarrollo e innovación de prototipos y procedimientos de cultivo larvario y fijación, para la producción de semilla individual y semilla en concha madre de ostión americano Crassostrea virginica en el laboratorio*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C, La Paz, México.
- Mazón-Suástegui, J. M., Barajas, F.J.D., Moctezuma, C.T., Tizoc, A.P.O. (2011c). *Desarrollo e innovación de prototipos y procedimientos para la preengorda de semilla de ostión americano Crassostrea virginica en el laboratorio*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C, La Paz, México.
- Mazón-Suástegui, J.M., Barajas, F.J.D., Moctezuma, C.T., Tizoc, A.P.O. (2011b). *Desarrollo e innovación de prototipos y procedimientos de cultivo de microalgas para la producción de semilla de ostión americano Crassostrea virginica en el laboratorio*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C, La Paz, México.
- Mazón-Suástegui, J.M., Moctezuma, C.T., de la Peña, M.A. (2009). *Análisis prospectivo comercial-económico para el cultivo de ostión Crassostrea virginica en el Estado de Tabasco; Relación costo-beneficio para diferentes tipos de artes de cultivo*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C, La Paz, México.
- Mazón-Suástegui, J.M., Robles, M.M., Diego, P.M., Avilés, Q.M.A., Moctezuma, C.T. (2009b). *Manual de cultivo para la engorda del ostion americano Crassostrea virginica*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C, La Paz, México.
- McFarland, K., Plough, L.V., Nguyen, M. y Hare, M.P. (2020). Are bivalves susceptible to domestication selection? Using starvation tolerance to test for potential trait changes in eastern oyster larvae. *Plos One*, 15(6): 23-34.
- Medeiros, I.D., Siebert, M.N., Toledo-Silva, G., Rodríguez, T.B., Marques, M.R. y Bainy, A.C. (2008). Induced gene expression in oyster *Crassostrea gigas* exposed to sewage. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 26(3): 362-365.
- Meena, D.K., Das, P., Kumar, S., Mandal, S.C., Prusty, S.A., Singh, S.K., Akhtar, M.S.K., Behera, K.B., Kumar, K. y Pal, A.K. (2013). Beta-glucan: an ideal immunostimulant in aquaculture (a review). *Fish Physiology & Biochemistry*, 39(1): 431-457. <https://doi.org/10.1007/s10695-012-9710-5>.
- Mellinger, J. (2002). Sexualité et Reproduction des poissons. *Molecular Biology*, 150(1): 409-417.
- Migaud, H., Bell, G., Cabrita, E., McAndrew, B., Davie, A., Bobe, J. y Carrillo, M. (2013). Gamete quality and broodstock management in temperate fish. *Reviews in Aquaculture*, 5(1): 194-

223.

- Modak, T.H., y Gómez C.M. (2020). Contrasting immunomodulatory effects of probiotic and pathogenic bacteria on eastern oyster, *Crassostrea virginica*, larvae. *Vaccines*, 8(4): 588-596.
- Monopoli, M.P., Åberg, C., Salvati, A. y Dawson, K.A. (2012). Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nature Nanotechnology*, 7(12): 779-786.
- Moraga, D., Meistertzheim, A. L., Tanguy-Royer, S., Boutet, I., Tanguy, A. y Donval, A. (2005). Stress response in Cu²⁺ and Cd²⁺ exposed oysters (*Crassostrea gigas*): an immunohistochemical approach. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 141(2): 151-156.
- Morales Sánchez, C. (2023). *Respuesta fisiológica y desempeño del camarón blanco penaeus vannamei (boone, 1931), a la aplicación de compuestos bioactivos altamente diluidos. Tesis Doctoral*. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, La Paz, México.
- Morales-González, E., Saura, M., Fernández, A., Fernández, J., Pong-Wong, R., Cabaleiro, S. y Villanueva, B. (2020). Evaluating different genomic coancestry matrices for managing genetic variability in turbot. *Aquaculture*, 520(1): 734-745.
- Morales-Sánchez, C., Arcos-Ortega, G.F., Tripp, Q.A., González, G.R. y Mazón-Suástegui, J.M. (2022). Effects of highly-diluted bioactive compounds (HDBC) on growth, survival and physiological condition of *Penaeus vannamei* shrimp reared in a commercial farm. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 50(3): 382-396.
- Moreira, R., Novoa, B. y Figueras-Huerta, A. (2019). Cellular aspects of innate immunity in molluscs. Elsevier, Amsterdam, pp. 1016-1098.
- Mukherjee, K., Korithoski, B. y Kolaczowski, B., (2014). Ancient origins of vertebrate-specific innate antiviral immunity. *Molecular Biology Evolution*, 31(1): 140–153.
- Natale, F., Hofherr, J., Fiore, G. y Virtanen, J. (2013). Interactions between aquaculture and fisheries. *Marine Policy*, 38(1): 205-213.
- Ni, J., Zeng, Z., Kong, D., Hou, L., Huang, H. y Ke, C. (2014). Vitellogenin of Fujian oyster, *Crassostrea angulata*: Synthesized in the ovary and controlled by estradiol-17 β . *General and Comparative Endocrinology*, 202(1): 35-43.
- Nikapitiya, C., McDowell, I. C., Villamil, L., Mu, P., Sohn, S. y Gómez-Chiarri, M. (2014). Identification of potential general markers of disease resistance in American oysters, *Crassostrea virginica* through gene expression studies. *Fish & Shellfish Immunology*, 41(1): 27-36.
- Nuseti, O., Marcano, L., Zapata, E., Esclapés, M., Nuseti, S. y Lodeiros, C., (2004). Respuestas inmunológicas y de enzimas antioxidantes en la ostra perla *Pinctada imbricata* (Mollusca: Pteridae) expuesta a niveles subletales de fuel oil n^o6. *Interciencia*, 29(6): 324-328.
- Nyholm, S. V. y McFall-Ngai, M. (2004). The winnowing: establishing the squid–vibrio symbiosis. *Nature Reviews Microbiology*, 2(8): 632-642.
- Oakley, J., Gold, A. J. y Bengtson, D. (2015). *Modeling the aquaculture carrying capacity of lake Toba, North Sumatra, Indonesia*. University of Rhode Island, Kingston.
- Oh, D. K., Jeong, H., Kim, J., Kim, Y., Kim, I., Ok, J. G. y Rho, J. (2021). Top-down nanofabrication approaches toward single-digit-nanometer scale structures. *Journal of Mechanical Science and Technology*, 35(1): 837-859.
- Olafsen, J.A. (1986). Invertebrate lectins: biochemical heterogeneity as a possible key to their biological function. *Immunity in Invertebrates*. Springer, Berlin, pp. 94–111.

- Osada, M., Harata, M., Kishida, M. y Kijima, A. (2004). Molecular cloning and expression analysis of vitellogenin in scallop, *Patinopecten yessoensis* (Bivalvia, Mollusca). *Molecular Reproduction and Development*, 67(3): 273-281.
- Osada, M., Takamura, T., Sato, H. y Mori, K. (2003). Vitellogenin synthesis in the ovary of scallop, *Patinopecten yessoensis*: Control by estradiol-17b and the central nervous system. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 299(2): 172-179.
- Palacios, E., Racotta, I.S., Arjona, O., Marty, Y., Le Coz, J.R., Moal, J. y Samain, J.F. (2007). Lipid composition of the Pacific lion-paw scallop, *Nodipecten subnodosus*, in relation to gametogenesis. 2. Lipid classes and sterols. *Aquaculture*, 266(1): 266-273.
- Pales-Espinosa, E. y Allam, B. (2018). Reverse genetics demonstrate the role of mucosal C-type lectins in food particle selection in the oyster *Crassostrea virginica*. *Journal of Experimental Biology*, 221(6): 74-94.
- Pales-Espinosa, E, Perrigault, M., Ward, J.E., Shumway, S.E. y Allam, B. (2009). Lectins associated with the feeding organs of the oyster, *Crassostrea virginica*, can mediate particle selection. *The Biological Bulletin*, 130(1): 130-141.
- Pales-Espinosa, E. y Allam, B. (2021). High spatial resolution mapping of the mucosal proteome of the gills of *Crassostrea virginica*: implication in particle processing. *Journal of Experimental Biology*, 224(4): 33-46.
- Pales-Espinosa, E. y Allam, B. (2013). Food quality and season affect gene expression of the mucosal lectin MeML and particle sorting in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 160(1): 1441-1450.
- Pales-Espinosa, E., Corre, E. y Allam, B. (2014a). Pallial mucus of the oyster *Crassostrea virginica* regulates the expression of putative virulence genes of its pathogen *Perkinsus marinus*. *International Journal for Parasitology*, 44(5): 305-317.
- Pales-Espinosa, E., Hassan, D., Ward, J.E., Shumway, S.E. y Allam, B. (2011). Role of epicellular molecules in the selection of particles by the blue mussel, *Mytilus edulis*. *The Biological Bulletin*, 219(1): 50-60.
- Pales-Espinosa, E., Perrigault, M. y Allam, B. (2010b). Identification and molecular characterization of a mucosal lectin (MeML) from the blue mussel *Mytilus edulis* and its potential role in particle capture. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 156(4): 495-501.
- Pales-Espinosa, E., Perrigault, M., Ward, J.E., Shumway, S.E. y Allam, B. (2009). Lectins associated with the feeding organs of the oyster, *Crassostrea virginica*, can mediate particle selection. *The Biological Bulletin*, 217(2): 130-141.
- Pales-Espinosa, E., Winnicki, S.M. y Allam, B. (2013). Early host-pathogen interactions in marine bivalves: Pallial mucus of *Crassostrea virginica* modulates the growth and virulence of its pathogen *Perkinsus marinus*. *Disease Aquatic Organism*, 104(3): 237-247.
- Panariti, A., Miserocchi, G. y Rivolta, I. (2012). The effect of nanoparticle uptake on cellular behavior: disrupting or enabling functions? *Nanotechnology, Science and Applications*, 3(2):87-100.
- Pérez-Chabela, M.D.L., Alvarez-Cisneros, Y., Soriano-Santos, J. y Pérez-Hernández, M.A. (2020). Los probióticos y sus metabolitos en la acuicultura. Una Revisión. *Hidrobiológica*, 30(1): 93-105.
- Pérez-López, J.L. (2022). *Implementación de un sistema de cultivo de Crassostrea virginica (Ostión del Golfo) a base de canastas australianas en Un sistema laguna Carmen-Pajonal-*

- Machona, Tabasco. Tesis de maestría.* Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, división académica de ciencias biológicas, Villahermosa.
- Perrigault, M., Tanguy, A. y Allam, B. (2009). Identification and expression of differentially expressed genes in the hard clam, *Mercenaria mercenaria*, in response to quahog parasite unknown (QPX). *BMC Genomics*, 10(17): 54-62.
- Peters, B.M., Shirliff, M. E. y Jabra-Rizk, M. A. (2010). Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs. *PLoS Pathogens*, 6(10): 67-81.
- Policar, T., Schaefer, F.J., Panana, E., Meyer, S., Teerlinck, S., Toner, D. y Źarski, D. (2019). Recent progress in European percid fish culture production technology—Tackling bottlenecks. *Aquaculture International*, 27(1): 1151-1174.
- Prado, S., Romalde, J.L. y Barja, J.L. (2010). Review of probiotics for use in bivalve hatcheries. *Veterinary Microbiology*, 145(3): 187-197.
- Puinean, A. M. y Rotchell, J.M. (2006a). Vitellogenin gene expression as a biomarker of endocrine disruption in the invertebrate, *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research*, 62(1): 211-214.
- Racotta, I.S., Ramirez, R.S., Ibarra, A.M., Rodríguez-Jaramillo, M.C., Carreño, D. y Palacios, E. (2003). Growth and gametogenesis in the lion-paw scallop *Nodipecten (Lyropecten) subnodosus*. *Aquaculture*, 217(4): 335–349.
- Rahman, M.F., Billah, M.M., Kline, R.J. y Rahman, M.S. (2023). Effects of elevated temperature on 8-OHdG expression in the American oyster (*Crassostrea virginica*): Induction of oxidative stress biomarkers, cellular apoptosis, DNA damage and γ H2AX signaling pathways. *Fish and Shellfish Immunology Reports*, 4(1): 79-100.
- Rajendran, E.S. (2015). An evaluation of Avogadro's number in the light of HRTEM and EDS studies of high dilutions of Ferrummetallicum6, 30, 200, 1M, 10M and 50Mc. *International Journal of High Dilution Research*, 14(3): 03-09.
- Rajendran, E.S. (2019). Homeopathy seen as personalised nanomedicine. *Homeopathy*, 108(1): 066-070.
- Ringo, E., Zhou, Z., Vecino, J.L.G., Wadsworth, S. y Romero, J. (2016). Understanding the gut microbiota in early-life stages of fish. *Aquaculture Research*, 47(3): 927-942.
- Rodríguez-Jaramillo M.C., Hurtado, M.A., Romero-Vivas E., Ramírez, J.L., Manzano, M. y Palacios, E. (2008). Gonadal development and histochemistry of the tropical oyster, *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) during an annual reproductive cycle. *Journal of Shellfish Research*, 27(5): 1129-1141.
- Rodríguez-Jaramillo, M.C. (2014). *Cambios Fisiológicos Durante la Gametogénesis en Respuesta a Incrementos de Temperatura Experimental y Natural: Comparación entre una Especie de Ostión Templada (Crassostrea gigas) y una Tropical (C. corteziensis)*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, México.
- Rodríguez-Jaramillo, M.C., García-Corona, J.L., Zenteno, S.T. y Palacios, E. (2022). The effects of experimental temperature increase on gametogenesis and heat stress parameters in oysters: Comparison of a temperate-introduced species (*Crassostrea gigas*) and a native tropical species (*Crassostrea corteziensis*). *Aquaculture*, 561(1): 73-83.
- Rodríguez-Jaramillo, M.C., Ibarra, A.M., Soudant, P. y Palacios, E. (2017). Comparison of quantitative gonad maturation scales in a temperate oyster (*Crassostrea gigas*) and a sub-tropical oyster (*Crassostrea corteziensis*). *Invertebrate Reproduction & Development*, 61(3): 147-156.

- Romero, J., Feijoó, C.G. y Navarrete, P. (2012). Antibiotics in aquaculture—use, abuse and alternatives. *Health and Environment in Aquaculture*, 159(1): 159-198.
- Rosero-García, A. (2017). *Evaluación de medicamentos Homeopáticos en el cultivo de Juveniles de pargo lunarejo Lutjanus guttatus*. Tesis de Maestría, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, La Paz, México.
- Rosero-García, A.P., Mazón-Suástegui, J.M., Dumas, S., Chávez-Sánchez, M.C., Avilés-Quevedo, A. y Rodríguez-Jaramillo, M.C. (2019). Effect of homeopathic medicines on intestinal Coccidia and immune response cell in Spotted Rose Snapper (*Lutjanus guttatus*). *Homeopathy*, 108(3):201-213.
- Sambrook, J. (2001). Preparation and analysis of the DNA of the Eukaryotic Genome. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 1-6.
- Saout, C., Paulet y Duinker, M.A. (1999). Histological study on the early stages of oogenesis in *Pecten maximus*: a new approach with quantitative semithin histology. International Pectinid Workshop, Norway, pp. 129-130.
- Secretaría de Salud. (2015). Farmacopea homeopática de los Estados Unidos Mexicanos. FEUM-SSA. Biblioteca Nacional de México 615.532-scdd21. ISBN: 978-607-460-509-9.
- Seenivasan, C., Radhakrishnan, S., Muralisankar, T. y Saravana-Bhavan, P. (2016). Effects of probiotics on survival, growth and digestive enzymes activities in freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man 1879). *Proceedings of the Zoological Society*, 69(1): 52-60.
- Smolowitz, R.A. (2013). Review of current state of knowledge concerning Perkinsus marinus effects on *Crassostrea virginica* (Gmelin) (the eastern oyster). *Veterinary Pathology*, 50(1): 404-415.
- Song, L., Wang, L., Qiu, L. y Zhang, H. (2010). Bivalve immunity. *Invertebrate Immunity*, 5(3): 44-65.
- Sorroza, L., Padilla-Castillo, D., Acosta-Arbelo, F., Román, L., Acosta-Hernández, B. y Real-Valcárcel, F. (2009). Uso de probióticos en Acuicultura. *Revista Canaria de las Ciencias Veterinarias*, 3(2): 8-15.
- Springer, S.A., Moy, G.W., Friend, D.S., Swanson, W.J., Vacquier, V.D. (2008). Oyster sperm bindin is a combinatorial fucose lectin with remarkable intra-species diversity. *International Journal of Developmental Biology*, 52(6): 759-768.
- Steppe, C.N., Fredriksson, D.W., Wallendorf, L., Nikolov, M. y Mayer, R. (2016). Direct setting of *Crassostrea virginica* larvae in a tidal tributary: applications for shellfish restoration and aquaculture. *Marine Ecology Progress Series*, 546(1): 97-112.
- Sudha, C. y Gokula, V. (2014). Reproductive response of the guppy fish *Poecilia reticulata* for homeopathic medicine, *Natrum muriaticum*. *Biolife*, 2(1): 932-935.
- Sumon, M.S., Ahmmmed, F., Khushi, S.S., Ahmmmed, M.K., Rouf, M.A., Chisty, M.A.H. y Sarower, M.G. (2018). Growth performance, digestive enzyme activity and immune response of *Macrobrachium rosenbergii* fed with probiotic *Clostridium butyricum* incorporated diets. *Journal of King Saud University-Science*, 30(1): 21-28.
- Sun, C. y Zhang, S. (2015). Immune-relevant and antioxidant activities of vitellogenin and yolk proteins in fish. *Nutrients*, 7(10): 8818-8829.
- Sun, M., Liu, G., Lin, H., Zhang, T. y Guo, W. (2018). Effect of salinity on the bioaccumulation and depuration of cadmium in the pacific cupped oyster, *Crassostrea gigas*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 62(1): 88-97.

- Sun, W., Li, L., Li, H., Zhou, K., Li, W. y Wang, Q. (2020). Vitellogenin receptor expression in ovaries controls innate immunity in the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) by regulating vitellogenin accumulation in the hemolymph. *Fish & Shellfish Immunology*, 107(1): 480-489.
- Suzuki, T., Hara, A., Yamaguchi, K. y Mori, K. (1992). Purification and immunolocalization of a vitellin-like protein from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biology*, 113(1): 239-245.
- Szmyt, M., Piech, P., Panasiewicz, G., Niewiadomski, P. y Pietrzak-Fiećko, R. (2021). Gonadal steroid fluctuations and reproduction results of European grayling (*Thymallus thymallus* L.) from broodstock farmed in a recirculation aquaculture system. *Animal Reproduction Science*, 224(1): 106-115.
- Tello-Olea, M., Rosales, M., Campa-Córdoba, A.I., Palestino, G., Luna, A.G., Reyes, M.B., Velázquez, M., Hernández, L.A. y Angulo, C. (2019). Gold nanoparticles (AuNP) exert immunostimulatory and protective effects in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 84(1): 756-767.
- Thomas, L.L., Allen Jr, S.K. y Plough, L.V. (2019). The effect of aquaculture gear on the growth and shape of the oyster *Crassostrea virginica* during a “finishing period” in Chesapeake Bay, USA. *Aquaculture*, 508(1): 1-9.
- Tian, J., Li, Y., Fu, H., Ren, L., He, Y., Zhai, S. y Liu, S. (2021). Physiological role of CYP17A1-like in cadmium detoxification and its transcriptional regulation in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Science of The Total Environment*, 796(1): 139-149.
- Tomaszewska, E., Soliwoda, K., Kadziola, K., Tkacz-Szczesna, B., Celichowski, G., Cichomski, M. y Grobelny, J. (2013). Detection limits of DLS and UV-Vis spectroscopy in characterization of polydisperse nanoparticles colloids. *Journal of Nanomaterials*, 60(1): 66-75.
- Tovar-Ramírez, D., Reyes-Becerril, M.C., Guzman-Villanueva, L., Gleaves-López, V., Civera-Cerecedo, R., Ascencio-Valle, F. y Linares-Aranda, M. (2008). Probióticos en acuicultura: avances recientes del uso de levaduras en peces marinos. *Avances en Nutrición Acuicola*, 12(3): 54-67.
- Trejo-Igueravide, R. (2017). Evaluación de los cultivos acuícolas en Tamaulipas, México. *Ciencia UAT*, 12(1): 114-133.
- Tresnati, J., Yasir, I., Aprianto, R., Yanti, A., Bestari, A. D. y Tuwo, A. (2020). Early maturity of Sandfish *Holothuria scabra* offers more prospective broodstock supply of a commercially important aquaculture species. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 564(1): 012089-012098.
- Tuong, N.T.C., Nguyen, X.H., Le, T.N.T., Masaru, M. y Ikuo, M. (2011). Identification and characterization of actinomycetes antagonistic to pathogenic *Vibrio spp.* isolated from shrimp culture pond sediments in Thua Thien Hue–Viet Nam. *BMC Genomics*, 56(1): 15–20.
- Vasta, G. (2009). Roles of galectins in infection. *Natural Review Microbiology* 7(1): 424–438.
- Venier, G.M. y Pallavicini, A. (2015). The genome of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* brings new insights on the massive expansion of the C1q gene family in Bivalvia. *Developmental & Comparative Immunology*, 49(1): 59-71.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. y Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4): 655-671.
- Vijay-Kumar, M., Aitken, J.D., Carvalho, F.A., Cullender, T.C., Mwangi, S., Srinivasan, S., Sitaraman, S.V., Knight, R., Ley, R.E. y Gewirtz, A.T. (2010). Metabolic syndrome and altered

- gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science*, 328(1): 228–231.
- Villaseñor, I.E., Campa-Córdova, A.I., Huerta-Aldáz, N., Luna-González, A., Mazón-Suástegui, J.M. y Flores-Higuera, F. (2013). Effect of beneficial bacteria in larval culture of Pacific white leg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal Microbiology*, 7(1):3471–3478.
- Vine, N.G., Leukes, W.D. y Kaiser, H. (2006). Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(3): 404-427.
- Vinueza-Burgos, C. (2009). PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 10(2): 1-13.
- Von-Roemeling, Jiang, W., Chan, C.K., Weissman, I.L. y Kim, B.Y.S. (2017). Breaking Down the Barriers to Precision Cancer Nanomedicine, *Trends Biotechnology*, 35(1): 159–171.
- Xiao, W. y Gao, H. (2018). The impact of protein corona on the behaviour and targeting capability of nanoparticle-based delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, 552(2): 328-339.
- Yamaura, K., Takahashi, K.G. y Suzuki, T. (2008). Identification and tissue expression analysis of C-type lectin and galectin in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 149(1): 168-175.
- Yoshizaki, G., y Yazawa, R. (2019). Application of surrogate broodstock technology in aquaculture. *Fisheries Science*, 85(1): 429-437.
- Yu, Q., Liu, M., Wei, S., Qin, X., Qin, Q. y Li, P. (2021). Research progress and prospects for the use of aptamers in aquaculture biosecurity. *Aquaculture*, 534(1): 736257-736264
- Yue, C., Li, Q. y Yu, H. (2018). Gonad transcriptome analysis of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* identifies potential genes regulating the sex determination and differentiation process. *Marine Biotechnology*, 20(2): 206-219.
- Zamora-George, A., Sevilla, M. y Aldana, D. (2003). Ciclo gonádico del ostión americano *Crassostrea virginica* (Lamellibranchia: Ostreidae) en Mecoaacán, Tabasco, México. *Revista de Biología Tropical*, 51(4): 109-117.
- Zar, J. H., (2007). *Biostatistical Analysis*. Pearson, New Jersey.
- Zhang, L., Li, L. y Zhang, G. (2011). A *Crassostrea gigas* Toll-like receptor and comparative analysis of TLR pathway in invertebrates. *Fish Shellfish Immunology*, 30(1): 653–660.
- Zhang, L., Li, L. y Zhu, Y. (2014). Transcriptome analysis reveals a rich gene set related to innate immunity in the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*). *Marine Biotechnology*, 16(1): 17–33.
- Zhdanov, V.P. y Cho, N.J. (2016). Kinetics of the formation of a protein corona around nanoparticles. *Mathematical Biosciences*, 282(1): 82-90.
- Zheng, H., Qian, Z., Helu, L., Wenhua, L., Zewei, S., Shengkang, L. y Tao, Z. (2012). Cloning and expression of vitellogenin (Vg) gene and its correlations with total carotenoids content and total antioxidant capacity in noble scallop *Chlamys nobilis* (Bivalve: Pectinidae). *Aquaculture*, (58(1): 366-367:
- Zhu, X., Li, J., Li, Q. y Wu, C. (2019). Effects of probiotics on growth, digestive enzyme activity, and disease resistance of *Crassostrea virginica*. *Fish & Shellfish Immunology*, 87(1): 245-251.