



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

**CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE  
JUVENILES DE *Crassostrea gigas* ANTE SU  
EXPOSICIÓN AL DINOFLAGELADO  
PRODUCTOR DE TOXINAS PARALIZANTES  
*Gymnodinium catenatum***

**TESIS**

Que para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales

(Orientación en Biotecnología )

Presenta

**Norma García Lagunas**

La Paz, Baja California Sur, Junio de 2014

## ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 06 del Mes de Junio del 2014, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"Cambios en la expresión génica de juveniles de *Crassostrea gigas* ante su exposición al dinoflagelado productor de toxinas paralizantes *Gymnodinium catenatum*"**

Presentada por el alumno:

**Norma Garcia Lagunas**

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

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

LA COMISION REVISORA

 Norma Y. Hernández Saavedra DIRECTOR DE TESIS	 Silvia A. Garcia Gasca CO-TUTOR
 Gopal Murugan CO-TUTOR	 Darriel Tovar Ramirez CO-TUTOR
 Alfonso N. Maeda Martinez CO-TUTOR	
 DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA, DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO	

## CONFORMACIÓN DE COMITÉS

### Directora de tesis

Dra. Norma Y. Hernández Saavedra CIBNOR, Campus La Paz.

### Comité Tutorial

Dra. Norma Y. Hernández Saavedra CIBNOR, Campus La Paz

Dra. Silvia A. García Gasca CIAD, Campus Mazatlán

Dr. Alfonso N. Maeda Martínez CIBNOR, Campus La Paz

Dr. Gopal Murugan CIBNOR, Campus La Paz

Dr. Dariel Tovar Ramírez CIBNOR, Campus La Paz

### Comité Revisor de Tesis

Dra. Norma Y. Hernández Saavedra CIBNOR, Campus La Paz

Dra. Silvia A. García Gasca CIAD, Campus Mazatlán

Dr. Alfonso N. Maeda Martínez CIBNOR, Campus La Paz

Dr. Gopal Murugan CIBNOR, Campus La Paz

Dr. Dariel Tovar Ramírez CIBNOR, Campus La Paz

### Jurado de Examen

Dra. Norma Y. Hernández Saavedra CIBNOR, Campus La Paz.

Dra. Silvia A. García Gasca CIAD, Campus Mazatlán

Dr. Alfonso N. Maeda Martínez CIBNOR, Campus La Paz

Dr. Gopal Murugan CIBNOR, Campus La Paz

Dr. Dariel Tovar Ramírez CIBNOR, Campus La Paz

### Suplente

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

Dra. Thelma Castellanos Cervantes CIBNOR, Campus La Paz

## RESUMEN

El ostión del Pacífico, *Crassostrea gigas*, es una especie filtroalimentadora, que acumula toxinas durante las floraciones algales nocivas (FAN). Las toxinas paralizantes (PST), son producidas por algunas especies de dinoflagelados, entre ellas *Gymnodinium catenatum*. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la exposición al dinoflagelado *G. catenatum* sobre la expresión génica de juveniles del ostión *C. gigas*. Los primeros bioensayos se realizaron con juveniles de  $3 \pm 1$  mm de talla, donde se probaron las siguientes dietas: control no tóxico (control negativo) *Isochrysis galbana* ( $0.75 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>), control tóxico (control positivo) *G. catenatum* ( $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) y dos dietas mixtas *G. catenatum* ( $3 \times 10^3$  y  $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) + *I. galbana* ( $0.75 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>). Se monitoreó el nivel de expresión de genes de proteínas de estrés, detoxificación, regulación de ácidos nucleicos, respuesta inmune y citoesqueleto en dos fases: aguda (24 h) y subcrónica (14 d). En los segundos bioensayos se utilizaron juveniles de  $50 \pm 10$  mm de talla y se probaron las dietas: control no tóxico *I. galbana* ( $2 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>), control tóxico *G. catenatum* ( $6 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) y mixta *I. galbana* ( $2 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>) + *G. catenatum* ( $6 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>), donde se analizó el nivel de transcripción de los genes mencionados anteriormente en glándula digestiva y hemocitos por 7 días. Los análisis se realizaron mediante PCR punto final y PCR en tiempo real (qRT-PCR). Además, se realizaron análisis histológicos en los ostiones de las dos tallas. Se encontró que los ostiones de ambas tallas al estar expuesto a *G. catenatum*, redujeron su tasa de aclaramiento y produjeron pseudoheces, los síntomas fueron tiempo-dosis-dependiente. Se demostró que una exposición aguda a *G. catenatum* sobreexpresó los siguientes genes: *sod-cu/zn*, *gst-s*, *gs*, *lgbp* y *cyp356A1* activando un mecanismo de respuesta inmediata al estrés y de protección a la toxicidad en el ostión; una exposición subcrónica incrementó significativamente el nivel de transcrito de dichos genes. La sobreexpresión de otros genes *p21* y *p53* proporciona una evidencia de daño al ADN y posible genotoxicidad. La represión de los genes de *act* y *tub β* probablemente indican una desestabilización del citoesqueleto. La sobreexpresión en *casp1* sugiere la activación de un proceso inflamatorio. En la glándula digestiva de los ostiones de mayor talla, se encontró sobreexpresión de los genes *p21*, *ef2*, *cafp55*, *p53*, *casp 1* y *act* a partir del día 3 con un incremento significativo en el día 7; esto sugiere una posible activación de los mecanismos celulares de la replicación y reparación del ADN dañado. En hemocitos, la mayor sobreexpresión de genes involucrados en sistema inmune (*lgbp*, *if44*, *cvt* y *hsp70*) se encontró a las 24 h de exposición, el aumento fue mayor en los ostiones expuestos al control tóxico. Por último, se corroboraron los daños en los tejidos de los organismos expuestos a *G. catenatum*, como: aplanamiento celular, inflamación, ruptura, exfoliación, y metaplasia en la glándula digestiva, inflamación generalizada y diapédesis de hemocitos en intestino, alteración de los filamentos branquiales, fusión en branquia, posible edema en músculo, principalmente en los ostiones de  $3 \pm 1$  mm. Estos resultados proporcionan cambios en el perfil de expresión génica mostrando una clara modulación de genes implicados en diferentes rutas esenciales para mantener la homeostasis del ostión del Pacífico, aunado al daño en los diferentes tejidos del ostión, ocasionado por la exposición al dinoflagelado productor de PST.

**Palabras clave:** Expresión génica, *Gymnodinium catenatum*, *Crassostrea gigas*, toxinas PST

## ABSTRACT

The Pacific oyster *Crassostrea gigas* is a filter feeding species that accumulates toxins associated with harmful algal blooms (HABs). Paralyzing toxins (PST) are produced by some dinoflagellate species and *Gymnodinium catenatum* is one of them. The aim of this study was to determine the effect of *G. catenatum* exposure on gene expression of juvenile oyster *C. gigas*. In the first bioassays juveniles  $3 \pm 1$  mm in length that were tested with the following diets: *Isochrysis galbana* nontoxic Control or negative control ( $0.75 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>), toxic control or positive control *G. catenatum* ( $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>), and two mixed diets of *G. catenatum* ( $3 \times 10^3$  and  $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) + *I. galbana* ( $0.75 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>). The level of expression of stress protein, detoxification, cell cycle regulation, immune response, and cytoskeleton was monitored in acute (24 h) and sub-chronic (14 days) periods. Second bioassays were performed on juveniles of  $50 \pm 10$  mm in size with diets: *I. galbana* negative control ( $2 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup>), *G. catenatum* positive control ( $6 \times 10^3$  cells mL<sup>-1</sup>), and mixed *I. galbana* ( $2 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup>) + *G. catenatum* ( $6 \times 10^3$  cells mL<sup>-1</sup>) in which transcript levels of the genes previously mentioned in the digestive gland and hemocytes was analyzed for 7 days. Analyses were performed by end point and real-time PCR (qRT-PCR). Furthermore, histological analyzes were performed in oysters from two sizes, finding that irrespective of size, oysters reduced their clearance rate and produced pseudofeces in the presence of *G. catenatum*, symptoms that were time-dose-dependent. It was demonstrated that acute exposure to *G. catenatum* produced overexpression of *sod-cu/zn*, *gst-s*, *gs*, *lgbp* and *cyp356A1* indicating activation of an immediate response mechanism to stress and toxicity protective in oysters; subchronic exposure significantly increased transcript levels. The up-regulation of others genes like *p21* and *p53* transcription provided a strong evidence of DNA damage and potential PST genotoxicity. Down-regulation of the *act* and *tub β* transcription genes might indicate a destabilization of the cytoskeleton arrangement. The up-regulation of the *casp 1* gene suggests activation of an inflammatory process. A significant expression increase was found in those genes participating on cell cycle regulation (*p21*, *p53*, *cafp55*, *ef2*), *act*, and *casp 1* on oysters' digestive gland mainly at days 3 and 7, suggesting a possible activation of these genes in the cellular replication and repair mechanisms of damaged DNA. In hemocytes, the overexpression of the genes involved in the immune system (*lgbp*, *if44*, *cvt y hsp70*) was found at 24-h exposure; the increase was greater in oysters exposed to the diet consisting only *G. catenatum*. Finally, damage such as cellular flattening, swelling, rupture, exfoliation, and metaplasia in digestive gland tubules; generalized inflammation, hemocyte infiltration or diapedesis through the epithelium of the intestine; structural deformities caused by fusion of the gill filaments, cell volume loss, and possible edema in muscle, mainly in oysters  $3 \pm 1$  mm were corroborated due *G. catenatum* exposure. Results of this study provide changes in the gene expression profile showing a clear modulation of the genes involved in different pathways essential for maintaining oysters' homeostasis, coupled with damage in different oysters' tissues caused by PST dinoflagellate that produces PST.

Key words: Gene expression, *Gymnodinium catenatum*, *Crassostrea gigas*, PST toxins

## DEDICATORIA

A mis padres:

Cristina Lagunas Amaya

Francisco García Lucas

## AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca otorgada para la realización de mis estudios.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, por las facilidades de transporte, de acceso y uso de sus instalaciones durante todo el tiempo que duró mi preparación para lograr la meta del Doctorado.

A la Dirección de Posgrado, dirigida por la Dra. Eliza Serviere Zaragoza (Osvelia Ibarra, Leticia Gonzáles, Claudia Olachea y Tania Nuñez) por todo el apoyo técnico, administrativo y económico que me brindó, para mi estancia y principalmente en los meses finales del trabajo.

Al comité de Tesis conformado por la Dra. Alejandra García, Dra. Norma Hernández, Dr. Alfonso Maeda, Dr. Dariel Tovar y Dr. Gopal Murugan, quienes me apoyaron en todo momento con revisiones de documentos, firmas, consejos y sugerencias para la mejora de este trabajo.

Un agradecimiento especial a mi directora de tesis la Dra. Norma Hernández, por todo su apoyo, por sus palabras de aliento en los momentos difíciles, por su confianza, enseñanzas, paciencia con mis revisiones y principalmente por su amistad.

Al técnico Arturo Sierra Beltrán por sus asesorías, consejos respecto a la realización del trabajo, apoyo para la realización de los bioensayos, por su disponibilidad a la hora de ayudar y por su amistad.

A la Dra. Reyna Romero, por todo su apoyo durante el desarrollo de los bioensayos y estandarización de las técnicas de laboratorio. Además, porque fuiste mi compañera de trabajo y gran maestra, por tus consejos en los momentos difíciles y por tu amistad incondicional.

A la M en C. Claudia Pérez por su ayuda en la toma de fotografías durante la realización de los bioensayos, por brindarme tu amistad incondicional e invitarme a conocer más de cerca los pastos marinos.

Al personal del Laboratorio de alimento vivo, Cynthia Aldana, Adriana Green y Julián Garzón,; así como al técnico encargado de los ceparios Marte Virgen, que gracias a ellos siempre conté con el material biológico necesario en cada uno de los experimentos.

Al Dr. Felipe Ascencio y la Dra. Marta Reyes por las facilidades otorgadas para el acceso a su laboratorio para llevar a cabo el trabajo de PCR en tiempo real.

Al grupo de Microbiología Ambiental, liderado por los Doctores Yoav Bashan y Luz Estela de Bashan por permitirme el uso del microscopio y recibirme en su laboratorio como miembro honorario del grupo. Así como al técnico responsable M en C Manuel Moreno por su ayuda invaluable en el asesoramiento de la parte estadística, por su disponibilidad a la hora de ayudar y por su gran amistad.

A la Maestra Diana Dorantes por su apoyo en la edición de los diversos documentos en inglés, por su paciencia, entusiasmo y estar siempre pendiente de mi bienestar incluso cuando estaba fuera del CIBNOR.

Al personal del Laboratorio de Histología e Histoquímica (Carmen Rodríguez) por las facilidades otorgadas en las preparaciones y análisis de muestras histológicas del trabajo.



A Pablo Monsalvo del Laboratorio de Aclimatación y Mantenimiento de Organismos Acuáticos por su gran ayuda en el asesoramiento y manejo de los ostiones.

Al personal del Laboratorio de Biología Reproductiva de Organismos Acuáticos (Marcos Quiñonez) por su ayuda en la medición de parámetros fisicoquímicos del agua durante los experimentos.

Al personal general de Posgrado (Horacio Sandoval, Edgar Yuen y Manuel Melero) por el apoyo técnico para la presentación de seminarios, avances de tesis y examen predoctoral.

Al técnico responsable del Laboratorio de Genética Molecular, la M en C. Delia Rojas, por su apoyo en el laboratorio durante el desarrollo de esta tesis.

A la Academia de Biotecnología por sus recomendaciones acerca del trabajo.

A mis compañeros y amigos por compartir momentos de reflexión, carnes asadas, días de playa etc (Reyna, Manuel, Luis, Edgar, Cynthia, Dr. Choix, Oscar y Angélica) y amigos que me han acompañado en la distancia (Alejandro, Seth, Gloria y Lúlu).

Por último, agradezco a mis padres (Cristina y Francisco) y a mis hermanos (Flor, July, Javier y Saúl) que siempre están incondicionalmente para escucharme y apoyarme en todo momento.

<b>CONTENIDO</b>	<b>Página</b>
Resumen	iii
Dedicatoria	V
Agradecimientos	Vi
Lista de Figuras	Xii
Lista de Tablas	Xvi
<b>1.- INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2.- ANTECEDENTES</b>	<b>4</b>
2.1 Generalidades de eventos de mareas rojas	4
2.2 Generalidades y estructura de toxinas PST.	6
2.3 Mecanismos de acción de las toxinas PST.	7
2.4 Presencia y bioacumulación de toxinas (PST) en moluscos bivalvos.	8
2.5 Generalidades de <i>Crassostrea gigas</i> .	12
2.6 Respuesta bioquímica y molecular a ficotoxinas en <i>C. gigas</i>	14
<b>3.- JUSTIFICACIÓN</b>	<b>20</b>
<b>4.- OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
4.1 Objetivo general	22
4.2 Objetivos particulares	22
<b>5.- HIPÓTESIS</b>	<b>23</b>
<b>6.- MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>23</b>
6.1 Descripción de las microalgas utilizadas en los bioensayos	23
6.1.1 <i>Isochrysis galbana</i>	23
6.1.2 <i>Gymnodinium catenatum</i>	24
6.2 Cultivo y cosecha del dinoflagelado	25
6.3 Bioensayos con juveniles de <i>C. gigas</i> (3 ± 1 mm)	26
6.3.1 Diseño experimental	26
6.4 Bioensayos con juveniles de <i>C. gigas</i> (50 ± 10 mm)	29
6.4.1 Diseño experimental	29
6.5 Extracción de ARN total y síntesis de ADN complementario (ADNc)	31
6.6 Diseño de oligonucleótidos para RT-PCR	32
6.7 Estandarización de las curvas de saturación y análisis de expresión mediante RT-PCR	34
6.8 Diseño de oligonucleótidos para qPCR	35
6.9 Estandarización de las condiciones para RT-qPCR	38
6.10 Determinación de la estabilidad de los genes de referencia candidatos para juveniles talla pequeña (3 ± 1 mm) de <i>C. gigas</i> .	39
6.11 Análisis cuantitativo de la expresión génica.	42
6.12 Determinación de la estabilidad de los genes de referencia candidatos tejido-específico (glándula digestiva y hemocitos) en juveniles (50 ± 10 mm) de <i>C. gigas</i> .	43
6.13 Análisis histológico en juveniles de <i>C. gigas</i> (3 ± 1 mm) y (50 ± 10 mm)	44
6.14 Análisis estadísticos	45
<b>7.- RESULTADOS</b>	<b>47</b>
7.1 Curva de crecimiento de <i>G. catenatum</i>	47
7.2 Observaciones generales del bioensayo con ostiones juveniles.	47

7.2.1 <i>C. gigas</i> de 3 ± 1 mm	47
7.2.2 <i>C. gigas</i> de 50 ± 10 mm	49
7.3 Tasa de aclaramiento (TA) de <i>C. gigas</i>	50
7.3.1 TA de ostiones de 3 ± 1 mm	50
7.3.2 TA de ostiones de 50 ± 10 mm	52
7.4 Extracción de ARN total	54
7.5 Estandarización de las curvas de saturación y análisis de la expresión mediante RT-PCR	56
7.6 Estandarización de la eficiencia de amplificación	58
7.7 Determinación de la estabilidad de los genes de referencia candidatos en juveniles de 3 ± 1 mm de <i>C. gigas</i>	60
7.7.1 Análisis GeNorm	61
7.7.2 Análisis NormFinder	62
7.7.3 Análisis BestKeeper	63
7.8 Análisis cuantitativo de la expresión de genes de respuesta a estrés, defensa antioxidante, sistema inmune y detoxificación celular en juveniles de 3 ± 1 mm de <i>C. gigas</i>	66
7.8.1 Bioensayo de exposición aguda con ostiones juveniles de 3 ± 1 mm de talla	67
7.8.2 Bioensayo de exposición subcrónica con ostiones juveniles de 3 ± 1 mm de talla	70
7.9 Análisis cuantitativo de la expresión de genes involucrados en la regulación celular, citoesqueleto, inflamación, apoptosis, cadena respiratoria y regulación proteica de juveniles de 3 ± 1 mm de <i>C. gigas</i> .	73
7.9.1 Genes del ciclo celular.	73
7.9.2 Genes del citoesqueleto y procesos inflamatorios.	76
7.9.3 Gen de citocromo oxidasa I ( <i>coi</i> ) y gen de tripsina ( <i>trp</i> ).	78
7.10 Determinación de la estabilidad de los genes de referencia candidatos en glándula digestiva y hemocitos en juveniles de 50 ± 10 mm de <i>C. gigas</i>	80
7.10.1 Análisis GeNorm	80
7.10.2 Análisis BestKeeper	81
7.10.3 Análisis NormFinder	81
7.11 Análisis cuantitativo de genes de regulación del ciclo celular, citoesqueleto, inflamación, apoptosis y detoxificación en glándula digestiva de juveniles de 50 ± 10 mm de <i>C. gigas</i>	84
7.11.1 Genes de regulación del ciclo celular.	84
7.11.2 Genes involucrados en procesos inflamatorios y el citoesqueleto.	87
7.12 Análisis cuantitativo de genes relacionados con la respuesta inmune en hemocitos de juveniles de 50 ± 10 mm de <i>C. gigas</i>	88
7.13 Análisis histológico en juveniles de <i>C. gigas</i> (3 ± 1 mm)	91
7.13.1 Glándula digestiva	91
7.13.2 Músculo, Manto y Branquia	92
7.14 Análisis histológico en juveniles de <i>C. gigas</i> 50 ± 10 mm	95
7.14.1 Glándula digestiva y otros tejidos	95

<b>8.- DISCUSIÓN</b>	95
8.1 Observaciones en el comportamiento alimenticio y tasas de aclaramiento en <i>Crassostrea gigas</i>	98
8.2 Efecto de <i>G. catenatum</i> en la expresión de genes de respuesta a estrés, defensa antioxidante, sistema inmune y detoxificación celular en <i>C. gigas</i> ( $3 \pm 1$ mm)	101
8.3 Efecto de <i>G. catenatum</i> en la expresión de genes de regulación del ciclo celular, citoesqueleto, inflamación apoptosis y cadena respiratoria en <i>C. gigas</i> ( $3 \pm 1$ mm)	112
8.4 Efecto de <i>G. catenatum</i> en la expresión de genes de regulación del ciclo celular, citoesqueleto, inflamación y apoptosis en glándula digestiva de <i>C. gigas</i> ( $50 \pm 10$ mm)	122
8.5 Efecto de <i>G. catenatum</i> en la expresión de genes de respuesta inmune en hemocitos de <i>C. gigas</i> ( $50 \pm 10$ mm)	123
8.6 Daños histológicos en <i>C. gigas</i> de $3 \pm 1$ mm y $50 \pm 10$ mm por el efecto de la presencia de <i>G. catenatum</i> .	128
<b>9.- CONCLUSIONES</b>	133
<b>10.- REFERENCIAS</b>	137
<b>11.- ANEXOS</b>	147

## INDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Parámetros de crecimiento de <i>G. catenatum</i> (en medio f/2 + Se, a 22 °C 35 ups y 150 $\mu\text{Em}^2\text{s}^{-1}$ ). Panel <b>a</b> , curva de crecimiento; panel <b>b</b> , tasa de crecimiento (divisiones/día).	47
<b>Figura 2.</b> Juveniles de <i>C. gigas</i> de $3 \pm 1$ mm alimentados con <i>I. galbana</i> control negativo a toxinas PST ( $0.75 \times 10^5$ cel $\text{mL}^{-1}$ ) ( <b>a</b> ), con <i>G. catenatum</i> control positivo a toxinas PST ( $3 \times 10^3$ cel $\text{mL}^{-1}$ ) ( <b>b</b> ), con dieta mixta <i>I. galbana</i> + <i>G. catenatum</i> $3 \times 10^3$ cel $\text{mL}^{-1}$ ( <b>c</b> ), con dieta mixta <i>I. galbana</i> + <i>G. catenatum</i> $30 \times 10^3$ cel $\text{mL}^{-1}$ ( <b>d</b> ).	49
<b>Figura 3.</b> Tasa de aclaramiento (TA) de <i>C. gigas</i> de $3 \pm 1$ mm durante 24 h. Control negativo, <i>I. galbana</i> $0.75 \times 10^6$ cel $\text{mL}^{-1}$ ; Control positivo, <i>G. catenatum</i> $3 \times 10^3$ cel $\text{mL}^{-1}$ . Tratamientos: dieta mixta <i>I. galbana</i> ( $0.75 \times 10^6$ cel $\text{mL}^{-1}$ ) y <i>G. catenatum</i> ( $3 \times 10^3$ cel $\text{mL}^{-1}$ ); dieta mixta <i>I. galbana</i> ( $0.75 \times 10^6$ cel $\text{mL}^{-1}$ ) y <i>G. catenatum</i> ( $30 \times 10^3$ cel $\text{mL}^{-1}$ )	52
<b>Figura 4.</b> Tasa de aclaramiento (TA) de <i>C. gigas</i> de $50 \pm 10$ mm durante 24 h. Control negativo, <i>I. galbana</i> ( $2 \times 10^6$ cel $\text{mL}^{-1}$ ); Control positivo, <i>G. catenatum</i> ( $6 \times 10^3$ cel $\text{mL}^{-1}$ ); dieta mixta <i>I. galbana</i> ( $2 \times 10^6$ cel $\text{mL}^{-1}$ ) + <i>G. catenatum</i> ( $6 \times 10^3$ cel $\text{mL}^{-1}$ ).	53
<b>Figura 5.</b> Perfil electroforético en gel de agarosa al 1% con TBE 1X de muestras de ARN total obtenidas mediante el método AGPC. Líneas: 1, marcador de peso molecular (1 Kb plus Ladder); 2-15 muestras de ARN total del bioensayo de exposición aguda de <i>C. gigas</i> a <i>G. catenatum</i> aleatoriamente seleccionadas. Técnica de tinción: EtBr; condiciones de separación, 80 V, 45 min.	55
<b>Figura 6.</b> Perfil electroforético en gel de agarosa/Synergel al 1% en TBE 1X de productos de PCR del gen 28S ARNr obtenidos en la prueba de identificación de contaminación con ADN del ARN de <i>C. gigas</i> extraído mediante el método AGPC. Líneas: 1, marcador de peso molecular (1 Kb plus Ladder) 2, control negativo (sin templado); 3, control positivo ADNc de <i>C. gigas</i> ; 4-7, muestras de ARN total. Técnica de tinción: EtBr; condiciones de separación, 80 V/45 min.	56
<b>Figura 7.</b> Perfil electroforético en gel de agarosa/Synergel <sup>®</sup> TBE al 1% de amplicones obtenidos en experimentos de saturación de PCR punto final para la evaluación de oligonucleótidos gen-específicos. Líneas: 1, marcador de peso molecular (1 Kb plus Ladder, Invotrogen); 2, (control negativo, sin templado); 20-50, ciclos de amplificación. Paneles: a, tubulina- $\beta$ ; b, 28S ARNr ribosomal; c, superóxido dismutasa tipo cobre/zinc. Técnica de tinción: EtBr; condiciones de separación, 80 V/1 h.	57
<b>Figura 8.</b> Curva estándar para el gen de referencia candidato actina ( <i>act</i> ), <b>a</b> ) valor umbral y eficiencia de amplificación, <b>b</b> ) regresión lineal, <b>c</b> ) curva de fluorescencia y <b>d</b> ) curva de disociación.	59

- Figura 9.** Curva estándar para el gen blanco *lps-β 1,3 glucano (lgbp)* **a)** valor umbral y eficiencia de amplificación, **b)** regresión lineal, **c)** curva de fluorescencia y **d)** curva de disociación 59
- Figura 10.** Curvas de disociación de **(a)** *tub β*, **(b)** *efl-a*, **(c)** *act*, **(d)** *gapdh* y **(e)** *28s ARNr*. 60
- Figura 11.** Promedio de la estabilidad de la expresión génica (M) de genes candidatos de referencia en *C. gigas* de  $3 \pm 1$  mm calculados con el software GeNorm. El valor de M bajo indica la media de los genes más estables (n = 18). 63
- Figura 12.** Determinación del número óptimo de genes de referencia para la normalización de análisis de la variación pareada (V) utilizando software GeNorm. Los valores indican la magnitud del cambio en el factor de normalización después de la inclusión de un gen de referencia adicional (n = 18). 64
- Figura 13.** Promedio de la estabilidad de la expresión génica de genes candidatos de referencia, en *C. gigas* de  $3 \pm 1$  mm calculados con GeNorm **(a)**, BestKeeper **(b)** y NormFinder **(c)** (n = 18). 65
- Figura 14.** Análisis de la expresión relativa (qPCR) de los genes: **a)** superóxido dismutasa cobre/zinc (*sod-cu/zn*), **b)** glutatión S transferasa (*gst-s*), **(c)** glutamina sintetasa (*gs*), **d)** proteína de unión a LPS y β-glucanos (*lgbp*), y **e)** del citocromo P450 isoforma *cpy356A1*. Los valores de expresión se muestran como expresión normalizada respecto a los genes de referencia *28s ARNr* y *gapdh* y relativo al calibrador (línea punteada). Las barras representan la desviación estándar (SD), mientras los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos y el control negativo (\*p<0.05, \*\*p=0.001; HSD de Fisher). 69
- Figura 15.** Análisis de la expresión relativa (qPCR) de los genes: **a)** superóxido dismutasa cobre/zinc (*sod-cu/zn*), **b)** glutatión S transferasa (*gst-s*), **c)** glutamina sintetasa (*gs*), **d)** proteína de unión a LPS y β-glucanos (*lgbp*), y **e)** del citocromo P450 isoforma *cpy356A1*. Los valores de expresión se muestran como expresión normalizada con los genes de referencia *28s ARNr* y *gapdh* y relativo al calibrador (línea punteada). Las barras representan la desviación estándar (SD), mientras que los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos y el control negativo (\*p<0.05, \*\*p=0.001; HSD de Fisher). 72
- Figura 16.** Análisis de la expresión relativa (qPCR) de los genes de *C. gigas* bajo exposición subcrónica a *G. catenatum*. Paneles: **a)** Factor 1 de ensamblaje de cromatina subunidad p55 (*p55*), **b)** Proteína p21 reguladora del ciclo celular (*p21*), **c)** Factor de elongación 2 (*ef2*), **d)** Proteína p53 (*p53*). Los valores de expresión se muestran como expresión normalizada con los genes de referencia *28S ARNr* y *gapdh* y relativo al calibrador (línea punteada). Las barras representan la desviación estándar (SD) y los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos y el control negativo (\*p < 0.05, \*\*p = 0.001; HSD de Fisher). 76

- Figura 17.** Análisis de la expresión relativa (qPCR) de los genes de *C. gigas* relacionados con el citoesqueleto y sistema inmune, bajo exposición a *G. catenatum*. Paneles: **a**) Actina (*act*); **b**) Tubulina  $\beta$  (*tub \beta*), **c**) Caspasa 1 (*caspl*). Los valores de expresión se muestran como expresión normalizada con los genes de referencia 28S ARNr y *gapdh* y relativo al calibrador (línea punteada). Las barras representan la desviación estándar (SD) y los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos y el control negativo (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p = 0.001$ ; HSD de Fisher). 78
- Figura 18.** Análisis de la expresión relativa (qPCR) de los genes *C. gigas* relacionados con la cadena respiratoria y la regulación proteica, bajo exposición a *G. catenatum*. Paneles: **a**) citocromo oxidasa I (*coi*), **b**) tripsina (*tryp*). Los valores de expresión se muestran como expresión normalizada con los genes de referencia 28s ARNr y *gapdh* y relativo al calibrador (línea de puntos). Las barras representan la desviación estándar (SD), los asterisco indican diferencias significativas entre los tratamientos y el control negativo (\* $p < 0.05$ , \*\* $p = 0.001$ ; HSD de Fisher). 79
- Figura 19.** Promedio de la estabilidad de la expresión de genes candidatos de referencia en glándula digestiva de *C. gigas* calculados con los softwares GeNorm (a), BestKeeper (b) y NormFinder (c) ( $n = 18$ ). 83
- Figura 20.** Análisis de la expresión relativa (qPCR) de los genes de *C. gigas* relacionados con la regulación del ciclo celular en glándula digestiva, bajo exposición subcrónica a *G. catenatum*. Paneles: a) Proteína p21 reguladora del ciclo celular (*p21*); b) Proteína p53 (*p53*); c) Factor 1 de ensamblaje de cromatina subunidad p55 (*cafp55*); d) Factor de elongación 2 (*ef2*). Los valores de expresión se muestran como expresión normalizada con genes de referencia *gapdh*, *ef1- $\alpha$*  y *tub  $\beta$*  y relativo al calibrador (línea de puntos). Las barras representan la desviación estándar (SD) mientras que el asterisco indica diferencias significativas entre los tratamientos y el control no toxico (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ ; HSD de Fisher). 86
- Figura 21.** Análisis de la expresión relativa (qPCR) de los genes de *C. gigas* relacionados con la regulación del ciclo celular y citoesqueleto en glándula digestiva, bajo exposición subcrónica a *G. catenatum*. Paneles: **a**) Actina (*act*), **b**) Caspasa 1 (*caspl*). Los valores de expresión se muestran como expresión normalizada con los genes de referencia *gapdh*, *ef1- $\alpha$*  y *tub  $\beta$*  (genes de referencia) y relativo al calibrador (línea de puntos). Las barras representan la desviación estándar (SD) y los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos y el control negativo (\* $p < 0.05$ , \*\* $p = 0.001$ ; HSD de Fisher). 86
- Figura 22.** Análisis de la expresión relativa (qPCR) de los genes de *C. gigas* de genes relacionados con la respuesta inmune en hemocitos de *C. gigas*, bajo exposición subcrónica a *G. catenatum*. Paneles: **a**) Proteína de unión a LPS y  $\beta$ -1,3glucano (*lgbp*); **b**) Proteína inducida por interferón 44 (*if44*); **c**) Cavortina (*cvt*); **d**) Proteína de shock térmico HSP70 (*hsp70*). Los valores de expresión se muestran como expresión normalizada con los genes de referencia *gapdh*, 28s ARNr y *ef1- $\alpha$*  y relativo al calibrador (línea de puntos). 90

Las barras representan la desviación estándar (SD) mientras que los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos y el control negativo (\* $p < 0.05$ , \*\* $p = 0.001$ ; HSD de Fisher).

**Figura 23.** Corte transversal de los túbulos de la glándula digestiva de juveniles de *C. gigas* de  $3 \pm 1$  mm, expuesto a *G. catenatum* teñidas con hematoxilina-eosina. **a)** organismo control alimentados con *I. galbana* ( $0.75 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ); **(b)** control toxico *G. catenatum* ( $3 \times 10^3$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ) **(c)** dieta mixta *I. galbana* ( $0.75 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ) + *G. catenatum* ( $3 \times 10^3$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ); **(d)** dieta mixta *I. galbana* ( $0.75 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ) + *G. catenatum* ( $30 \times 10^3$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ) (Microscopio olympus BX41, 100 X). 92

**Figura 24.** Cortes de diferentes tejidos en juveniles de *C. gigas* de  $3 \pm 1$  mm, expuesto a *G. catenatum* teñidas con hematoxilina-eosina. Musculo estriado **a)** organismo control alimentados con *I. galbana* ( $0.75 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ); **(b)** dieta mixta *I. galbana* + *G. catenatum* ( $30 \times 10^3$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ). Branquia **c)** organismo control alimentados con *I. galbana* ( $0.75 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ); **(d)** dieta mixta *I. galbana* + *G. catenatum* ( $30 \times 10^3$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ). Manto **e)** organismo control alimentados con *I. galbana* ( $0.75 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ); **(f)** dieta mixta *I. galbana* + *G. catenatum* ( $30 \times 10^3$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ) (Microscopio olympus BX41, a 100 X). 94

**Figura 25.** Histopatología del intestino de *C. gigas* de  $50 \pm 10$  mm de talla, teñidas con hematoxilina-eosina. **Glándula digestiva (a)** organismo control alimentados con *I. galbana* ( $2 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ); **(b)** y **(c)** organismo alimentados con *I. galbana*  $2 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$  y *G. catenatum*  $6 \times 10^3$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ; **intestino (d)** organismo control alimentados con *I. galbana* ( $2 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ); **(e)** y **(f)** organismo alimentados con *I. galbana*  $2 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$  y *G. catenatum*  $6 \times 10^3$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ; **branquia (g)** organismo control alimentados con *I. galbana* ( $2 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ); **(h)** organismo alimentados con *I. galbana*  $2 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$  y *G. catenatum*  $6 \times 10^3$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ; **Manto (i)** organismo control alimentados con *I. galbana* ( $2 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ); **(j)** organismo alimentados con *I. galbana*  $2 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$  y *G. catenatum*  $6 \times 10^3$  cel  $\text{mL}^{-1}$ . Microscopio olympus BX41, a 40 X y 100 X (c y f). 97



## INDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla I.</b> Relación de genes estudiados y su función bioquímica	18
<b>Tabla II.</b> Diseño experimental del bioensayo de exposición de <i>C. gigas</i> ( $3 \pm 1$ mm) a <i>G. catenatum</i> .	28
<b>Tabla III.</b> Relación de genes, números de acceso a GenBank de secuencias de cDNA de <i>C. gigas</i> utilizados para el diseño de <i>primers</i> para RT-PCR.	33
<b>Tabla IV.</b> Relación y características generales de oligonucleótidos diseñados para análisis de RT-qPCR (* genes candidatos).	37
<b>Tabla V.</b> Concentraciones de ADNc probadas para las curvas estándar.	39
<b>Tabla VI.</b> Criterios de evaluación de las metodologías de extracción de ARN total probadas.	54
<b>Tabla VII.</b> Concentración y pureza del ARN total de las muestras obtenidas del bioensayo de exposición aguda de <i>C. gigas</i> a <i>G. catenatum</i> .	55
<b>Tabla VIII.</b> Análisis de estabilidad de los genes de referencia en hemocitos de <i>C. gigas</i>	84

## 1. INTRODUCCIÓN

En el ambiente marino, la presencia de Floraciones Algales Nocivas (FAN), coloquialmente conocidas como “marea roja”, causa grandes mortandades a través de las diferentes redes tróficas. Los problemas sobre el efecto de los FAN no son exclusivos de organismos marinos en su medio natural, sino también se han reportado casos en granjas de cultivo como las granjas ostrícolas de las costas de California, Oregón y Washington (en E.U.A.), y en las costas mexicanas de Sonora y Baja California, donde se registraron mortandades de hasta el 90%. Problemas similares se presentaron en la granja ostrícola SOL AZUL, ubicada en el estero El Cardón (San Ignacio, B.C.S.) durante Febrero, Mayo y Octubre de 1998, donde los organismos mayormente afectados fueron las larvas fijadoras (semillas) de *Crassostrea gigas*.

Es bien sabido que las toxinas paralizantes o Paralytic Shellfish Poisoning (PST, por sus siglas en inglés) pueden acumularse en los tejidos de los moluscos bivalvos a través de los procesos de alimentación. Por ello, se han realizado varios estudios enfocados a observar el efecto de la ingesta de dinoflagelados productores de dichas toxinas, que abarcan desde comportamiento alimenticio (Bricelj y Shumway, 1998; Bougrier et al., 1997; Wilsh et al., 1998, Hegaret et al., 2007), la cinética de acumulación (Laabir et al., 2007) y los mecanismos de depuración (Guégen et al., 2008) hasta los daños tisulares (Hegaret et al., 2007; Haberkorn et al., 2010 a,b). Sin embargo, aún no ha sido posible establecer una relación directa causa-efecto entre la mortandad de moluscos y la presencia de eventos de

marea roja; en virtud de que las mortandades ocurrieron en zonas de cultivo, es imperativo estudiar el efecto de estas toxinas a nivel fisiológico y molecular.

Con base a lo anterior, en el presente estudio se planteó realizar el análisis de los efectos de la exposición de juveniles de ostión *C. gigas* (dos tallas) al dinoflagelado tóxico *Gymnodinium catenatum*. En la primera parte de este estudio se utilizaron juveniles de ostión de  $3 \pm 1$  mm de talla, porque en este estadio son más vulnerables a cualquier tipo de estrés y es la talla que utilizan para la siembra en el sector acuícola, por lo que cualquier impacto negativo afecta directamente al sector económico.

Se monitoreó el nivel de expresión de genes involucrados en diferentes vías metabólicas en dos escenarios de exposición: una exposición de fase aguda (24 h de duración) y una de fase subcrónica (durante 14 d), en las que se probaron dos concentraciones del dinoflagelado tóxico ( $3 \times 10^3$  y  $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) en dietas mixtas con *Isochrysis galbana*, incluyendo un control positivo a toxinas PST ó control tóxico (el dinoflagelado en dieta unialgal) y un control negativo a toxinas PST ó control no tóxico (*I. galbana*). Para el análisis de la expresión génica se realizó un tamizado preliminar mediante la técnica de RT-PCR al determinar semicuantitativamente la expresión de 25 genes involucrados en siete procesos metabólicos (proteínas de respuesta generalizada a estrés, cadena respiratoria, regulación de ácidos nucleicos, comunicación celular, genes de respuesta inmune, de citoesqueleto, regulación proteica y metabolismo energético). Con base en esos resultados, se realizó una selección de los genes potencialmente regulados (en términos de

sobreexpresión o subexpresión) a los que se le determinó la tasa de expresión mediante la técnica de RT-qPCR.

En la segunda parte de la investigación, se utilizaron ostiones de  $50 \pm 10$  mm de talla. Se probó sólo una concentración del dinoflagelado tóxico ( $6 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) basada en registros de la concentración máxima observada en eventos naturales) en una dieta mixta con *I. galbana*, un control positivo a toxinas PST ( $6 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>), dieta unialgal con *G. catenatum*) y un control no tóxico (*I. galbana*), por un periodo de 7 días (exposición a mediano plazo). Se realizaron análisis de la expresión génica (RT-qPCR) principalmente en: 1) glándula digestiva, por ser el órgano blanco para la acumulación de toxinas, considerando genes involucrados en la regulación del ciclo celular, inflamación, apoptosis y citoesqueleto; 2) en hemocitos se analizaron genes involucrados en respuesta inmune debido a que la principal función de estas células es la defensa contra agentes dañinos. Finalmente, se realizaron análisis histológicos en muestras de los ostiones de ambas tallas con el fin de identificar y caracterizar los cambios promovidos por la ingesta del dinoflagelado toxico a nivel tisular.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades de eventos de mareas rojas.

El fitoplancton, que comprende al conjunto de organismos acuáticos autótrofos del plancton que tienen capacidad fotosintética y que viven en la columna de agua, es un alimento esencial para los organismos filtradores, especialmente los moluscos bivalvos (ostiones, ostras, mejillones y almejas). Ciertas condiciones (combinación de factores físicos, químicos y biológicos) como por ejemplo una situación de exceso de nutrientes y/o temperatura favorable, pueden provocar que el fitoplancton se multiplique formando lo que se suele llamarse un florecimiento (*bloom*, por su traducción al idioma inglés), marea roja o floraciones masivas. Cuando se presentan estos eventos y ocasionan efectos negativos son denominados “Florecimientos Algales Nocivos” (FAN), y pueden clasificarse como:

- Inocuos: son aquellos en los que las especies que forman el FAN producen cambios en la coloración de las masas de agua, siendo totalmente inofensivas; de hecho, en muchas ocasiones son benéficas y responsables de la alta productividad primaria de ciertas regiones costeras.
- Nocivos: las especies del fitoplancton florecen tan densamente que matan indiscriminadamente peces e invertebrados (especialmente en sistemas de cultivo intensivo) al agotar el oxígeno, disminuir el paso de la irradiación solar y dañando sus branquias.

- Tóxicos: las especies que conforman los FAN (generalmente dinoflagelados, diatomeas o cianobacterias) producen toxinas, que se incorporan rápidamente en las cadenas tróficas; este tipo de florecimientos no está necesariamente asociado a cambios evidentes en la coloración de los cuerpos de agua. Se han descrito 300 especies tóxicas entre ellas *Gymnodinium catenatum*.

De esta forma las toxinas pueden llegar a los consumidores finales, por ejemplo, en el humano, provocando según sea el caso seis tipos (Hallegraeff, 1995; Lindahl, 1998):

1. Toxinas paralizantes de mariscos, o PSP (Paralytic Shellfish Poisoning)
2. Toxinas diarreicas de mariscos, o DSP (Diarrhetic Shellfish Poisoning).
3. Toxinas amnésicas de mariscos, o ASP (Amnesic Shellfish Poisoning)
4. Toxinas neurotóxicas de mariscos, o NSP (Neurotoxic Shellfish Poisoning)
5. Toxinas azaspirácidas de mariscos
6. Ciguatoxinas, o CFP (Ciguatera Fish Poisoning)

Por tanto, los FAN pueden tener efectos negativos causando pérdidas económicas para la acuicultura, pesquerías y turismo (Burgess y Shaw, 2001), con su consecuente impacto negativo al ambiente y la salud humana (Hallegraeff, 1995; Andersen, 2004; Matsuyama y Shumway, 2009).

El impacto de los FAN sobre los moluscos bivalvos en las costas de México es un hecho que se ha observado cada vez con mayor frecuencia (Cortés-Altamirano et al., 1998b). En la región Noroeste de México, particularmente la Costa Occidental de la península de

B.C.S. y Golfo de Baja California, es común que estacionalmente se presenten eventos FAN (Lechuga-Devéze y Morquecho-Escamilla 1998). Cortés-Altamirano et al. (1998b), definen la época de mayor incidencia de mareas rojas de Febrero a Mayo (observándose en Abril las mareas rojas más tóxicas, particularmente para la costa este del Golfo de California (Ochoa et al., 1997; Sierra Beltrán et al., 1998). En la región de Baja California Sur las especies que han sido reportadas con mayor frecuencia son: *Gymnodinium catenatum*, *Akashiwa sanguinea*, *Noctiluca scintillans*, *Gonyaulax polyedra*, *Prorocentrum dentatum*, *Porocentrum minimum* y *Pseudo-nitzschia australis* (Cortés et al., 1998b).

En la mayoría de los países se considera a las toxinas PST como un grupo, con límites establecidos en 400 UR/100 g o 80 µg eq de STX/100 g de carne; en México el límite reglamentario es de 30 µg eq de STX/100 g (Aune, 2001).

## **2.2 Generalidades y estructura de las toxinas PST.**

Las toxinas paralizantes o PST (son neurotoxinas, producidas por diversas especies de dinoflagelados de zonas tropicales o templadas, principalmente de los géneros: *Alexandrium*, *Gymnodinium* y *Pyrodinium* (Bricelj y Shumway, 1998; FAO, 2005). Las toxinas paralizantes PST o PSP (por sus siglas en inglés, Paralytic Shellfish Poisson) reciben este nombre porque en el humano, al ingerir bivalvos contaminados, provocan parálisis muscular y, en casos graves, la muerte (Bricelj y Shumway, 1998). Los síntomas descritos van desde un leve entumecimiento o picazón, hasta parálisis respiratoria completa, que en casos fatales, ocurre entre dos y doce horas después de la ingestión (FAO, 2005). Los bivalvos que se alimentan de estos dinoflagelados acumulan las toxinas sin

sufrir efectos nocivos aparentes; la tasa de acumulación y depuración de estas toxinas varía ampliamente según la especie (Blanco et al., 2003), sin embargo, la transmisión de estas fitotoxinas a humanos y a otros organismos consumidores se da a través de las redes tróficas (Bricelj y Shumway, 1998).

Se han descrito aproximadamente 21 formas moleculares de toxinas tipo PST que han sido aisladas de dinoflagelados tales como: *Alexandrium catenella*, *G. catenatum* y *Pyrodinium bahamense var. compressum* (Yasumoto et al., 1995). Las toxinas PST se dividen en cuatro subgrupos: 1) el grupo carbamato que incluye: STX, neoSTX y las goniautoxinas GNTX 1-4); 2) las del grupo N-sulfo-carbamoil: GNTX 5-6 y C1-4); 3) el grupo decarbamoil (dc-): dcSTX, dcneoSTX y dcGNTX1-4) y, finalmente, el grupo 4) compuestos de desoxidecarbamoil (do): doSTX, doneoSTX y doGNTX 1); su toxicidad varía ampliamente, siendo más tóxicas las del grupo carbamato (FAO, 2005; Kodama 2010). La saxitoxina (STX), fue el primer compuesto marino cuyo origen se asoció al fitoplancton (Shimizu, 1993).

### **2.3 Mecanismos de acción de las toxinas PST.**

La toxinas PST bloquean selectivamente, y con mucha afinidad, el canal de sodio dependiente del voltaje. Este canal, consiste de una proteína de aproximadamente 250 kDa, que atraviesa la membrana plasmática de muchas células excitables; se caracteriza por una conducción uniforme, depende del potencial y presenta selectividad iónica. Esta proteína se encuentra en los nervios de los mamíferos, en las fibras del músculo esquelético y en la mayoría de las fibras del músculo cardíaco. Una vez que la célula se despolarizó



correctamente, la conformación de la molécula del canal de sodio cambia. Se abre un canal acuoso que permite el desplazamiento del ion  $\text{Na}^+$  de la fase extracelular hacia el interior de la célula, mediante fuerzas electroquímicas; el flujo de sodio hacia el interior causa un aumento de la fase del potencial de acción. Las membranas también presentan canales de sodio dependientes del voltaje que, cuando se abren, permiten el desplazamiento  $\text{K}^+$  intracelular hacia afuera, con la consecuente re-polarización. La STX, y varias otras toxinas del tipo PST, bloquean el canal de sodio dependiente del voltaje con mucha potencia, haciendo más lento o anulando la propagación del potencial de acción, pero sin afectar el canal de potasio (FAO, 2005). Se ha observado que la duración del bloqueo del canal está relacionada reversiblemente con la concentración de toxinas y depende de la constante de asociación (Mons et al., 1998; Kodama, 2010).

#### **2.4 Presencia y bioacumulación de toxinas (PST) en moluscos bivalvos.**

En moluscos bivalvos, el proceso de filtración transporta las células y los quistes de los dinoflagelados al tracto digestivo. La digestión, que ocurre en el estómago y en los divertículos, es el proceso mediante el cual las toxinas PST se liberan y entran a los órganos digestivos. El sistema digestivo de los moluscos bivalvos posee varias estructuras anatómicas, siendo una de las más importantes la glándula digestiva. Anatómicamente se conecta al estómago y físicamente la glándula recubre en su totalidad al estómago conectándose posteriormente al tubo digestivo (Gosling, 2003). La glándula digestiva está involucrada en el almacenamiento de azúcares y lípidos; estas reservas energéticas son movilizadas durante los procesos de gametogénesis o utilizadas en los eventos de estrés

ambiental. Por la función endocítica de sus células, la glándula digestiva resulta ser el principal sitio de acumulación de compuestos tóxicos (Gosling, 2003). La mezcla de toxinas que se aloja en los tejidos del molusco varía según el tipo, cepa y/o especie del dinoflagelado en cuestión, así como la concentración de toxinas varía con el tiempo y las condiciones ambientales. Se ha observado que el 96% de la toxicidad total se encuentra en las vísceras, que constituyen alrededor del 30% del peso total de tejido. Particularmente en almejas, la toxina se acumula rápidamente en las vísceras, disminuyendo gradualmente. Sin embargo, después de un periodo de latencia de cuatro semanas o más, las toxinas han llegado a detectarse en el sifón (Mons et al., 1998).

En los diferentes tejidos de algunos moluscos como las vieiras, se ha estudiado la toxicidad observándose en general que: 1) el músculo aductor casi no acumula toxinas, 2) la glándula digestiva, manto, gónada y branquias, retienen toxinas y 3) la toxicidad varía de acuerdo a la estación del año (Bricelj y Shumway, 1998). Una vez absorbidas y distribuidas, las toxinas pueden biotransformarse aumentando en ocasiones su toxicidad para los mamíferos, entre ellos el hombre (Mons et al., 1998; Choi et al., 2003).

En el laboratorio, algunos ensayos de alimentación han demostrado que los mejillones consumen rápidamente concentraciones de *Alexandrium* iguales o mayores que las que causan el cese del bombeo y el cierre de las valvas (Navarro et al., 2010). Los resultados de los estudios electrofisiológicos, con nervios aislados de bivalvos de la costa atlántica, muestran que los ostiones son sensibles a las toxinas, mientras que el mejillón es relativamente poco sensible (Mons et al., 1998). Blanco et al. (1997) estudiaron la cinética

de la eliminación de toxinas en el mejillón *Mitylus galloprovincialis* expuesto a una florecimiento de *G. catenatum* observando que el perfil de toxinas del molusco resulta ser muy similar al del dinoflagelado, lo que indica que (en este caso) la biotransformación tiene muy poca o ninguna importancia. En otros estudios Wildish et al. (1998) observaron que *C. gigas* alimentados con *Alexandrium tamarensis* y *Alexandrium fundyense*, tóxicos y no tóxicos, abren y cierran las valvas, lo que sugiere que las toxinas PST no están directamente involucradas en la inhibición de la respuesta inicial a la alimentación. En los ostiones control (alimentados con *Isochrysis* sp.) se observó un mayor crecimiento, en tanto que se obtuvieron evidencias adicionales en el comportamiento de apertura/cierre de las valvas, al alimentar ostiones previamente aclimatados con *Isochrysis* sp. con mezclas de *Alexandrium/Isochrysis*.

Lassus et al. (2000) estudiaron la eliminación de toxinas con un grupo de individuos adultos de *C. gigas* contaminados experimentalmente con toxinas PST (por exposición a *Alexandrium minutum*) en concentraciones entre 150 y 300  $\mu\text{g}$  eq de STX/100 g, y alimentados con dietas de diatomeas o dinoflagelados no tóxicos. Si bien, se observó que la cantidad de toxinas varió de individuo en individuo, los autores determinaron que el tiempo de eliminación de toxinas se encuentra entre los tres y cuatro días, hasta alcanzar el umbral de seguridad de 80  $\mu\text{g}$ /100 g. Las tasas de eliminación de distintos grupos de ostiones alimentados con *I. galbana*, *Tetraselmis suecica*, *Thalassiosira weissflogii* o con *Skeletonema costatum* no presentaron diferencias significativas. Los autores observaron que el perfil de toxinas durante el proceso de depuración está dominado por GNTX2 y GNTX3, mientras que los porcentajes de toxinas C fueron relativamente bajos, y la STX y

neoSTX no fueron detectables. El perfil de toxinas de los ostiones resulto ser igual al de *A. minutum* lo que sugiere que en el ostión no hay biotransformación. Laabir et al. (2007), observaron que *C. gigas*, produce heces y pseudoheces que contienen quistes intactos y viables cuando son alimentados con *A. catenella* y *A. minimum*. El contenido de las toxinas PST totales de las células germinadas de dichos quistes fue menor que en las células utilizadas como alimento. Por lo tanto, los autores concluyen que los quistes y las nuevas células germinadas representan una vía potencial de transferencia de las toxinas PSP a otros niveles tróficos.

Yan et al. (2001) estudiaron la inhibición de la eclosión y la supervivencia de las larvas de *Chlamys farreri* expuestas a distintas concentraciones de *A. tamarensis*. En huevos fértiles se registró solo un 30% de nacimientos y 5% en el grupo testigo con una exposición de 36 horas a células o fragmentos celulares de *A. tamarensis* en concentraciones de 100 y 500 cel mL<sup>-1</sup>, respectivamente; no se observó respuesta inhibitoria exponiendo los huevos a STX o contenidos celulares. El alga también afectó las larvas en estadio D temprano de la vieira y se observó un considerable descenso en las tasas de supervivencia bajo exposición durante 6 días a concentraciones >3 x10<sup>3</sup> cel mL<sup>-1</sup>, mientras que ninguna larva sobrevivió a una exposición de 14 días a concentraciones de 1x10<sup>4</sup> cel mL<sup>-1</sup>. El estudio concluyó que los estadios de desarrollo previos a la blástula son los más sensibles a las toxinas de *A. tamarensis*.

## 2.5 Generalidades de *Crassostrea gigas*.

El ostión japonés u ostión del Pacífico es el nombre común utilizado para el molusco bivalvo *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). Esta es una especie, originaria de Japón, fue introducida a diferentes regiones del mundo gracias a su gran capacidad de tolerancia y adaptación a cambios en los factores bióticos y abióticos, y a su potencial de rápido crecimiento, por lo que actualmente es considerada una especie cosmopolita de gran importancia comercial. Además, es uno de los mejores modelos de estudio científico dentro del grupo de los bivalvos, porque son los principales bioindicadores de contaminación ambiental, además de sus estudios a nivel bioquímico, molecular (Saavedra y Bachére, 2006) y actualmente se tiene secuenciado su genoma completo (Zhang *et al.*, 2012).

*C. gigas* fue introducida en México a principios de los años setenta, y su cultivo se encuentra altamente desarrollado en la región Noroeste, particularmente en los estados de Baja California, Baja California Sur, Sonora, Sinaloa y Nayarit. La producción ostrícola en 2011 fue del orden de 3 955 t, con una tendencia al aumento. Actualmente a nivel mundial la producción de esta especie es una de las más importantes en la industria acuícola (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2013).

En cuanto a la anatomía interna, el cuerpo se encuentra envuelto por el manto, que está involucrado en la síntesis de la concha y en las funciones sensoriales, el organismo es capaz de presentar retracción ante estímulos nerviosos (Goslin *et al.*, 2003). La masa encefálica está ausente; el estómago es utilizado en la digestión del alimento y continúa en un

intestino y un recto hasta el ano. La glándula digestiva es un órgano que rodea al estómago. *C. gigas* posee un par de branquias lamelares que se extienden en la región ventral (desde la boca hasta el ano) con función respiratoria, excretora y nutricia. Posee un órgano muscular (músculo abductor) empleado para la apertura y cierre de las valvas. Las branquias también presentan tejido muscular, lo que permite mantener la circulación de la hemolinfa (carente de pigmentos transportadores de oxígeno) (Goslin, 2003).

La hemolinfa es impulsada por el corazón, ubicado en la cavidad pericardíaca, adyacente al músculo abductor. El corazón impulsa la hemolinfa a través de arterias que bañan los órganos, y la hemolinfa es colectada posteriormente en senos venenosos para su paso a través de las branquias (FAO, 2006).

Para obtener su alimento, el ostión japonés hace pasar el agua a través de sus branquias, reteniendo la materia orgánica en su sistema digestivo. *C. gigas* filtra el alimento del agua y lo dirige hacia los palpos labiales donde se clasifica antes de pasar a la boca; los bivalvos tienen la capacidad de seleccionar el alimento filtrado del agua. El bolo alimenticio, amalgamado por el moco, pasa a la boca y a veces es rechazado por los palpos labiales y eliminado en forma de las denominadas pseudoheces (Goslin, 2003; Helm et al., 2006).

El sistema inmune de los moluscos está constituido de hemocitos, proteínas plasmáticas y reacciones integradas en sistemas multiméricos que involucran ambos componentes: celular y humoral (Manduzio et al., 2005). Durante la fagocitosis (hemocitos macrófagos) el primer mecanismo de defensa se inicia con la producción de enzimas antioxidantes

(superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa) ante el estrés generado por especies reactivas de oxígeno (EROs) y de nitrógeno (ERNs),

## **2.6 Respuesta bioquímica y molecular a ficotoxinas en *C. gigas***

Se ha reportado que la exposición a estresores ambientales como contaminantes, metales pesados y microalgas tóxicas, podría requerir una mayor demanda energética para protección y reparación celular y procesos de destoxificación (Haberkorn et al., 2010). En particular, es bien conocido que la síntesis de proteínas se incrementa durante condiciones de estrés dadas por temperatura o contaminación, debido a la inducción de chaperonas moleculares tales como proteínas de estrés al calor y metalotioneinas. Adicionalmente, las células se protegen contra el peligro generado por el estrés oxidativo inducido también por estas condiciones de estrés, incrementando la producción de enzimas antioxidantes. Este incremento en la síntesis de proteínas, refleja una elevada actividad del proceso transcripcional ya que se han observado incremento en la abundancia de ARN (Boutet et al., 2003b).

Los procesos moleculares y rutas metabólicas involucrados en la respuesta celular a toxinas paralizantes son aún desconocidos, sin embargo, se ha reportado el efecto a nivel bioquímico y molecular de otras ficotoxinas en diferentes organismos. Estudios previos han documentado cambios en la expresión de genes o proteínas en el sistema nervioso central de ratas y peces como consecuencia de la exposición aguda al ácido domoico (toxina

producida por diatomeas de los generos *Nitzschia* y *Pseudo-nitzschia*), modificando la expresión de genes involucrados en la transducción de señal y la regulación de la transcripción (Salierno et al., 2006). Lefebvre et al. (2009) mencionan que los factores de transcripción son los primeros en responder ante una exposición al ácido domoico.

En moluscos, las bases moleculares y celulares de la respuesta a las toxinas fitoplanctónicas son poco conocidas. Recientemente, se ha descubierto que las diferencias respecto a la sensibilidad a la toxina paralizante (PST) entre poblaciones de la almeja americana *Mya arenaria* están relacionadas con el polimorfismo de un gen que codifica la subunidad de un canal de sodio (Bricelj et al., 2005). Este polimorfismo resulta en la sustitución de un residuo de ácido glutámico presente en la región del poro exterior del canal de los animales sensibles a la toxina, por el ácido aspártico presente en los organismos resistentes. Estrada et al. (2007) encontraron variación en la actividad de varias enzimas: superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa en *Nodipecten subnodosus* expuesto a *G. catenatum*; la actividad de catalasa y glutatión peroxidasa fue mayor en glándula digestiva, seguida de manto, branquia y músculo, mientras que la actividad de superóxido dismutasa disminuyó en branquia y músculo. También encontraron que la exposición a *G. catenatum* incrementa la actividad de tripsina,  $\alpha$ -quimotripsina y  $\alpha$ -galactosidasa.

Por su parte Haberkorn et al. (2010 a), observaron que una exposición de *C. gigas* a células de *A. minimum* produce incrementos significativos en la concentración de especies reactivas de oxígeno (EROs), la cual depende de la temporada de exposición y de la condición de ploidía de los organismos: en relación a la estación anual fue mayor en abril y



disminuyó significativamente en Mayo, y en relación a la ploídia esta fue mayor en organismos triploides; en cambio la actividad profenol oxidasa disminuyó significativamente en ambos tipos de organismos.

Sin embargo, los procesos moleculares y las vías metabólicas implicadas en la respuesta celular del ostión del Pacífico a la presencia de toxinas PST son poco conocidas a nivel transcripcional. Estudios recientes revelaron que los genes implicados en el metabolismo oxidativo y mitocondrial como la catalasa, glutatión peroxidasa y citocromo oxidasa C; en la inmunidad como interleucina 17; y en el proceso de desintoxicación (proteína de resistencia a múltiples fármacos) fueron reprimidos transcripcionalmente por la exposición a *A. minutum* (Mat et al., 2013). Núñez-Acuña et al. (2013) encontraron niveles de expresión génica diferencialmente alta de la superóxido dismutasa, catalasa, ferritina y proteína de choque térmico en la glándula digestiva de *Mytilus chilensis* expuestos a saxitoxina.

Por otra parte, algunos estudios indican que las toxinas marinas son genotóxicas y también pueden actuar como iniciadores de tumores (Wikfors, 2005; Landsberg, 2002; González-Romero et al, 2012). El estrés genotóxico desencadena una variedad de respuestas celulares, incluyendo la activación transcripcional de los genes que regulan la reparación del ADN, la detención del ciclo celular y la apoptosis (Mirzayans et al., 2012). González-Romero et al. (2012) reportaron que la remodelación de la cromatina desempeña un papel clave en la activación transcripcional de los factores reguladores en respuesta a una variedad de señales de estrés.

La respuesta de los organismos ante las toxinas depende de diversos factores, siendo los más importantes las propiedades específicas, físicas y químicas del compuesto y la concentración (Huvet et al., 2004). Una vez que ingresa la toxina al organismo, es absorbida y distribuida por el sistema circulatorio hasta llegar a las células blanco que son las que tienen los receptores (suele ser una proteína) para cada compuesto químico específico (Huvet et al., 2004). Cuando la concentración del compuesto tóxico dentro de la célula es grande, los receptores se saturan produciéndose una respuesta tóxica máxima, mientras que cuando la concentración es baja, la respuesta es menor (Denslow et al., 2007).

Las toxinas paralizantes son toxinas termoestables, altamente hidrofílicas y específicas a las células nerviosas, en las que bloquean los canales de sodio dependiente de voltaje. Por lo tanto, su característica hidrofílica no permite su paso a través de la membrana celular por lo que se unen de manera reversible al sitio 1 del canal de sodio, bloqueando el poro (FAO, 2005). Al no poder ingresar a la célula, las toxinas PST no pueden actuar de manera directa, sin embargo, el bloqueo puede funcionar como una señal extracelular para fosforilar o desfosforilar proteínas que se encuentran en la membrana, que a su vez actúan como segundos mensajeros, ocasionando así una cascada de respuestas alteradas a nivel celular, particularmente en la expresión de los genes.

En general, se ha descrito el comportamiento de los organismos expuestos a una sustancia tóxica y como ésta podría estar influenciando la expresión de genes. Durante las primeras horas, después de iniciada la exposición, se empiezan a dar los cambios en la expresión de genes: 1) En tiempos cortos o dosis bajas, los genes que son inducidos tienden a ser

adaptativos, protegiendo al organismo de la toxicidad (Denslow et al., 2007). En organismos expuestos a metales, y para una gran variedad de estresores como es el caso del presente trabajo, se ha observado la inducción de la expresión de genes que codifican proteínas de respuesta a estrés como las metalotioneinas y las proteínas de shock térmico (Jenny et al., 2002). 2) Al incrementarse la dosis, el organismo intenta compensar mediante la interrupción de ciertas vías metabólicas provocadas por la exposición, y nuevas vías metabólicas son activadas resultando en la expresión de un nuevo grupo de genes. Estos cambios son importantes para el organismo y diferentes de los involucrados en la adaptación, asociándose directamente con la adversidad provocada por el tóxico (Denslow et al., 2007).

En la tabla I, se describe la función de los genes que fueron monitoreados en el presente trabajo.

**Tabla I.** Relación de genes estudiados y su función bioquímica.

Nombre del gene	Función
Glutamina sintetasa ( <i>gs</i> )	Esta enzima es esencial en el metabolismo del nitrógeno, cataliza la reacción química de glutamato y amonio para formar Glutamina (aminoácido con dos átomos de nitrógeno); su biosíntesis en el cuerpo ayuda a “limpiar” de amoníaco algunos tejidos.
Glutación-S-transferasa ( <i>gst-s</i> )	Familia de enzimas detoxificantes que catalizan la conjugación de glutatión reducido (a través del grupo sulfhidrilo) a centros electrofílicos en una amplia variedad de sustratos. Desintoxica, entre otros, lípidos peroxidados, puede enlazar toxinas y funcionar como transporte de proteínas.
Proteína de shock térmico 70 ( <i>hsp70</i> )	Proteínas de shock térmico de 70kDa. Familia de proteínas (chaperonas) que protegen a las células del estrés térmico y oxidativo al evitar la pérdida de estructura de las proteínas mediante su unión temporal a las mismas a través de los residuos hidrofóbicos; impide la agregación y facilita el plegamiento.
Superóxido dismutasa tipo cobre-zinc ( <i>sod- cu/zn</i> )	La enzima superóxido dismutasa (SOD) es una importante defensa antioxidante en la mayoría de las células expuestas a oxígeno, al protegerlas de las reacciones dañinas del radical superóxido dismutándolo a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno.
Citocromo oxidasa ( <i>coi</i> )	Enzima óxido-reductasa que cataliza el último paso de la cadena de transporte electrónico, transfiere los electrones a moléculas de oxígeno y la reduce a 2H <sub>2</sub> O.
Citocromo p450	Son un grupo grande y diverso de enzimas que generalmente constituyen la

( <i>cyp450</i> )	primera fase de desintoxicación clase I en los organismos. Estas enzimas, metabolizan una amplia variedad de sustratos, tales como ácidos grasos, hormonas y xenobióticos.
Tripsina ( <i>trip</i> )	Es una enzima que hidroliza enlaces peptídicos en las proteínas para formar péptidos de menor tamaño y liberar aminoácidos.
Proteína p21 ( <i>p21</i> )	Proteína reguladora del ciclo celular a nivel de la fase G1 cuando existe crecimiento celular con síntesis de proteínas y ARN.
Factor de ensamblaje de la cromatina ( <i>cap55</i> )	Proteína que actúa en la acetilación de histonas (histona acetiltransferasa, HAT) y participa en la transcripción a través de la regulación epigenética de diferentes procesos celulares, de ensamblaje y maduración de la cromatina.
Proteína p53 ( <i>p53</i> )	En los mamíferos la proteína p53 desempeña un papel central en la supervisión de la integridad del genoma, además de otras funciones importantes en la detención del ciclo celular, reparación del ADN, apoptosis y la carcinogénesis.
Factor de elongación 2 ( <i>fe2</i> )	Es una enzima de la familia de las GTPasa que participa en la elongación durante la síntesis de proteína.
Caspasa 1 ( <i>cp1</i> )	Pertenecen a una familia de cisteín-aspartato proteasas altamente específicas y conservadas; constituyen el núcleo de la maquinaria para la apoptosis celular.
Actina ( <i>act</i> )	El citoesqueleto de actina es una red dinámica de polímeros de actina y gran variedad de proteínas asociadas. Sus principales funciones fisiológicas están relacionadas con la motilidad celular y los cambios de forma de la célula durante el ciclo celular. Es esencial en algunas funciones contráctiles y controla interacciones celulares, adhesión molecular y transporte intracelular.
$\beta$ -Tubulina ( <i>tub <math>\beta</math></i> )	Principal componente del citoesqueleto. Los microtúbulos intervienen en diversos procesos celulares que involucran desplazamiento de vesículas de secreción, movimiento de orgánulos, transporte intracelular de sustancias, así como durante la división celular (mitosis y meiosis).
Proteína de unión a lipopolisacárido y $\beta$ -1,3 glucano ( <i>lgbp</i> ) Cavortina ( <i>cvt</i> )	Participa en la activación de la cascada profenoloxidasas que es una respuesta general de sistema inmune innato en invertebrados.  Es una proteína no pigmentada, glicosilada con actividad de inhibición de serin-proteasas, que se asocia con hierro lo que indica que puede funcionar como agente quelante del hierro
Proteína de interferón 44	Proteína implicada en defensa antiviral, actividad antiproliferativa y posiblemente contribuye a la detención del ciclo celular ya que provoca una disminución de GTP celular y suprime la señalización de cinasas reguladas por una señal extracelular.
Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa ( <i>gapdh</i> )	La gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) cataliza la oxidación de un aldehído, el gliceraldehído-3-fosfato (reacción exergónica) y sintetiza un acil-fosfato, el 1,3-difosfoglicerato (1,3-bisfosfoglicerato) (reacción endergónica).
Factor de elongación 1 ( <i>ef1-<math>\alpha</math></i> )	Proteína con múltiples subunidades que es responsable de la unión dependiente del GTP de los aminoacil-ARNt a los ribosomas eucarióticos. La subunidad (EF1- $\alpha$ ) se une al aminoacil-ARNt y los transfiere al ribosoma en un proceso vinculado a la hidrólisis del GTP.
28s ribosomal	ARN ribosomal subunidad 28S.

---

### 3. JUSTIFICACIÓN

El impacto de los florecimientos de dinoflagelados tóxicos sobre los moluscos bivalvos en las costas de México es un hecho que se ha observado cada vez con mayor frecuencia (Cortés-Altamirano et al., 1998b). En la región Noroeste de México, particularmente la Costa Occidental de la península de B.C.S. y Golfo de Baja California, es común que estacionalmente se presenten eventos FANs (Lechuga-Devéze y Morquecho-Escamilla, 1998).

Los problemas ocasionados por efecto de las mareas rojas no son exclusivos de organismos marinos en su medio natural, sino también se han reportado casos en granjas de cultivo (como en granjas ostrícolas de las costas de California, Oregón y Washington, en E.U.A.), así como en las costas mexicanas de Sonora y Baja California, donde en los cultivos se alcanzaron mortandades de hasta el 90%. Problemas similares se presentaron en la granja ostrícola SOL AZUL, ubicada en el estero El Cardón (San Ignacio, B.C.S.) durante Febrero, Mayo y Octubre de 1998, donde ocurrieron mortandades considerables de los “stocks” de *C. gigas*; los organismos mayormente afectados fueron las larvas fijadoras (semillas).

En virtud de que las mortandades ocurrieron en zonas de cultivo, es imperativo estudiar el efecto de estas toxinas a nivel fisiológico y molecular, principalmente en juveniles de talla pequeña, debido a que en dicho estadio son más vulnerables ante cualquier tipo de estrés, además son más susceptibles a las toxinas que los juveniles de mayor talla y adultos,

debido a que no cuentan con un sistema enzimático efectivo para eliminar dichos compuestos y su tasa metabólica de crecimiento es más alta (Vasconcelos et al., 2010). Desde el punto de vista ecológico, esta talla corresponde a la principal cohorte responsable del reclutamiento poblacional, por lo que cualquier efecto negativo en su sobrevivencia afectaría directamente los tamaños poblacionales y por lo tanto, las cadenas tróficas a varios niveles.

A pesar de toda la información existente de los efectos de las toxinas PST en moluscos bivalvos, aún falta conocimiento del mecanismo de acción, de los procesos moleculares y rutas metabólicas involucradas en respuesta a estas toxinas, sobre inmunotoxicidad, citotoxicidad, genotoxicidad; además, de estudios que evalúen los efectos subcrónicos o crónicos. El monitoreo de genes específicos, involucrados en rutas metabólicas esenciales para mantener la homeostasis del ostión *C. gigas*, será importante para conocer el efecto que tiene la exposición a diferentes concentraciones de células de *G. catenatum* y el tiempo de exposición, y detectar que genes son los que están siendo más alterados o más susceptibles a la presencia de estos organismos FAN. Por lo tanto, estudios moleculares sobre la expresión diferencial serán útiles como modelo de interacción entre este dinoflagelado tóxico con poblaciones naturales de otros moluscos bivalvos.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general.

Determinar el efecto de la exposición a *Gymnodinium catenatum*, productor de toxinas paralizantes sobre la expresión génica en juveniles de ostión del Pacífico *Crassostrea gigas*.

### 4.2 Objetivos particulares.

- Determinar el efecto de la exposición aguda y subcrónica a *Gymnodinium catenatum* en juveniles ( $3 \pm 1$  mm) de *Crassostrea gigas*, sobre la expresión de genes seleccionados mediante RT-PCR y RT-qPCR.
- Determinar el efecto de exposición subcrónica a *Gymnodinium catenatum* en juveniles ( $50 \pm 10$  mm) de *Crassostrea gigas*, sobre la tasa de expresión de genes seleccionados en glándula digestiva y hemocitos por RT-qPCR.
- Evaluar el daño histológico en juveniles ( $3 \pm 1$  mm) y ( $50 \pm 10$  mm) de *C. gigas* como respuesta al efecto de una exposición a *G. catenatum*.

## 5. HIPÓTESIS

Si la exposición de c gigas a *Gymnodinium catenatum* induce cambios en la expresión de genes relacionados al mantenimiento de la homeostasis celular entonces, estos cambios podrán ser identificados al monitorear la expresión de genes de respuesta al estrés, detoxificación, sistema inmune, inflamación, regulación de ácidos nucleicos y citoesqueleto.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Descripción de las microalgas utilizadas en los bioensayos.

Para llevar a cabo los experimentos se utilizaron dos cepas de dos microalgas, las cuales forman parte de la colección de Microalgas del CIBNOR (Laboratorio de alimento vivo y Cepario, Programa de Acuicultura, CIBNOR).

#### 6.1.1 *Isochrysis galbana*

*I. galbana* es una microalga de color amarillo con dos flagelos móviles, sin pared celular. Mide entre 6 y 8  $\mu\text{m}$ , crece a temperaturas entre 16 y 35°C, salinidades entre 25 y 28 ups e iluminación intermedia 150  $\mu\text{E m}^2\text{s}^{-1}$ . Por su alto contenido de ácidos grasos



poliinsaturados, esta especie es es muy importante en la acuicultura como alimento para las larvas de moluscos bivalvos y de camarón (Fábregas et al., 1985). La cepa utilizada fue la ISG-1 y los cultivos fueron crecidos en bolsas de plástico con medio f/2, mantenidos a  $20 \pm 1$  °C bajo iluminación constante y a  $150 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidad de luz.

### 6.1.2 *Gymnodinium catenatum*

*G. catenatum* (cepa GCCV-6) es un dinoflagelado desnudo, con formas unicelulares con dos flagelos disimilares: un flagelo que nace en una hendidura transversal (*sulcus*) y otro longitudinal que se aloja en una hendidura longitudinal (*cingulum*); el flagelo transversal es el que provee la mayor fuerza de empuje a la célula para el nado. Se presentan células de 34-65  $\mu\text{m}$  de largo y 27-43  $\mu\text{m}$  de ancho, es formador de cadenas, y la cepa fue aislada de Bahía Concepción, B.C.S., México (Band-Schmidt et al., 2005). Esta especie es capaz de producir toxinas paralizantes del tipo C (C1-4), neosaxitoxina (NEO), gonyautoxinas (GTX1-4), toxinas decarbamoil (dcSTX, dcGTX) (Band-Schmidt et al., 2005, 2010) y saxitoxina (STX) que es la forma más peligrosas por su toxicidad (80  $\mu\text{g}/100$  g de carne de molusco), hidrosolubilidad y termoestabilidad (FAO, 2005). La cepa GCCV-6 produce entre 25.7-101 pg/cel de STX<sub>eq</sub> (Pérez-Linares et al., 2008, 2009) y ha sido responsable de severos episodios tóxicos PSP. Los florecimientos de *G. catenatum* se presentan generalmente en la primavera, pero algunos han ocurrido en el otoño-invierno, alcanzando densidades de 78 a  $6.6 \times 10^2$  cel  $\text{mL}^{-1}$  (Cortés-Altamirano, 1998b). *G. catenatum* tiene una amplia distribución mundial, principalmente en zonas cálidas y

templadas (Green et al., 2004). En México se localiza desde el Golfo de California hasta las costas del estado de Oaxaca (Cortés-Altamirano et al., 1998b).

## 6.2 Cultivo y cosecha del dinoflagelado.

Para cultivar *G. catenatum* se utilizó el medio f/2 + Se (Guillard, 1975), preparado con agua de mar (35 ups) filtrada con membranas de 0.45  $\mu\text{m}$  y esterilizada en autoclave (121°C, 15 lb, 20 min). Se realizaron cultivos estáticos de 1,000 mL en matraces Fernbach de 2.8; los cultivos se mantuvieron en el Cepario del CIBNOR en cámaras adaptadas con lámparas de luz blanca (irradiación de 150  $\mu\text{E m}^2\text{s}^{-1}$ ) y ciclos de luz y oscuridad 12:12 h, a una temperatura de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Para monitorear la tasa de crecimiento (número de divisiones/día) y la densidad celular de los cultivos a utilizar en los bioensayos, se tomaron alícuotas de 1.5 mL por triplicado cada 48 horas (de todos los cultivos), desde el día cero (día de inoculación) hasta que los cultivos alcanzaron la fase de muerte (día 26). Enseguida se fijaron con una gota de lugol ( $\text{I}_2$ , 5%/KI 10%), y se llevaron a cabo conteos celulares directos al microscopio utilizando una cámara Sedgwick Rafter. La fórmula para obtener el número de células  $\text{mL}^{-1}$  fue la siguiente:

$$\text{Número de células/mL} = \text{No. células totales} \times \text{factor de dilución} \times 10,000 \quad (1)$$

La tasa de crecimiento fue calculada utilizando la siguiente fórmula:

$$\mu = (\text{Log}_2 B_n - \text{Log}_2 B_0) / (t_n - t_0) \quad (2)$$

Para el reto experimental de exposición de los ostiones, el dinoflagelado se cosecho al final de la fase de crecimiento exponencial (18 días de cultivo). Se prepararon tres mezclas de *I. galbana* y *G. catenatum*, que se utilizaron como dietas para los ostiones, por lo tanto, para alcanzar la densidad celular deseada, los cultivos fueron diluidos o concentrados (según lo requerido). Para el tratamiento con la mayor densidad celular ( $30 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$ ) varios lotes de cultivo de *G. catenatum* se homogenizaron, se midió el volumen total, se tomaron alícuotas (por triplicado) para el conteo y las células se cosecharon mediante centrifugación a  $2500 \times g$  10 minutos a  $20^\circ\text{C}$ . El sobrenadante se desechó y la biomasa sedimentada se resuspendió en un nuevo volumen de medio de cultivo para alcanzar la densidad celular requerida para el tratamiento.

### **6.3 Bioensayos con juveniles de *C. gigas* ( $3 \pm 1 \text{ mm}$ ).**

#### 6.3.1 Diseño experimental

Se utilizaron *C. gigas* diploides, de talla entre  $3 \pm 1 \text{ mm}$ , provistos por el laboratorio de producción “Acuacultura Robles SPR de RI”. Los organismos se aclimataron en el Laboratorio Húmedo de Seguridad Biológica (LHSB, CIBNOR) por un periodo de dos semanas, en recipientes plásticos de 10 L con agua de mar filtrada ( $0.45 \mu\text{m}$ ), con flujo de

oxígeno, a 21°C y salinidad controlada (34 ups). La dieta consistió de  $0.75 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup> de *Isochrysis galbana* libre de bacterias, obtenida del Laboratorio de Alimento Vivo del CIBNOR.

Para determinar la respuesta (en términos de expresión génica) de *C. gigas* ante su exposición a *G. catenatum* tóxico, se llevó a cabo un bioensayo de exposición aguda (24 h) probando tres diferentes concentraciones del dinoflagelado (Tabla I).

Los organismos (25) fueron colocados en frascos de vidrio de 100 mL, utilizando ½ de su capacidad (50 mL). Bajo estas condiciones, los organismos se aclimataron durante cuatro días con una dieta a base de *I. galbana* ( $0.75 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>) hasta la realización del experimento. Los frascos contaron con sistema de aireación constante y se mantuvieron a una temperatura de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  (clima artificial automatizado). Los ostiones fueron expuestos a diferentes concentraciones celulares de microalgas (mezclas, tabla I) para tener una exposición directa al dinoflagelado tóxico; se prepararon tres tratamientos y dos controles. Las mezclas de microalgas se prepararon con una proporción 1:1 del volumen de cada una en un volumen final de 50 mL; cada tratamiento se evaluó por triplicado y se proporcionó en una sola dosis diaria.

**Tabla II.** Diseño experimental del bioensayo de exposición de *C. gigas* ( $3 \pm 1$  mm) a *G. catenatum*.

Tratamientos	N	Microalgas (cel mL <sup>-1</sup> )	
		<i>I. galbana</i>	<i>G. catenatum</i>
Control negativo a toxinas PSP	3n	$0.75 \times 10^5$	Cero
Control positivo a toxinas PSP	3n	Zero	$3 \times 10^3$
T1	3n	$0.75 \times 10^5$	$0.3 \times 10^3$
T2	3n	$0.75 \times 10^5$	$3 \times 10^3$
T3	3n	$0.75 \times 10^5$	$30 \times 10^3$

Notas: (3) es el número de repeticiones, (n) es el número de ostiones juveniles por unidad experimental (25).

Se realizaron observaciones de supervivencia y comportamiento alimenticio al determinar la tasa de aclaramiento bajo cada condición experimental. Para ello se tomaron muestras de agua de cada una de las unidades experimentales al finalizar el experimento, determinándose el número residual de células. Posteriormente, para determinar la disminución en la concentración de las microalgas en los bioensayos debido a la filtración de los ostiones en determinado intervalo de tiempo, se calculó la tasa de aclaramiento (TA) mL h<sup>-1</sup> mediante la siguiente ecuación (Coughlan, 1969):

$$TA = \text{Ln} (N_0/N_t) * M/t \quad (3)$$

dónde:

$N_0$  es la concentración inicial de la microalga en el medio de crecimiento

$N_t$  es la concentración después de 24 horas

$M$  es el volumen total que se utilizó en cada unidad experimental, y

$t$  es el tiempo después de iniciar el experimento (24 h).

Para determinar los cambios en la expresión génica, se realizaron siete muestreos: uno en la hora cero y cuatro correspondientes a las 3, 6, 12 y 24 h de exposición al dinoflagelado (respuesta aguda), así como a los 3, 7 y 14 días (respuesta subcrónica). En cada tiempo de muestreo se colectaron cinco ostiones por réplica. Los organismos muestreados de cada unidad experimental (correspondientes a cada tiempo de muestreo), fueron reemplazados por ostiones expuestos a las mismas condiciones experimentales (unidades experimentales solo para reemplazo) de forma que el número de organismos en cada unidad experimental se mantuvo constante durante los bioensayos. Las muestras fueron colocadas en tubos Eppendorf, fueron lavadas con agua de mar estéril y finalmente congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis.

#### **6.4 Bioensayos con juveniles de *C. gigas* ( $50 \pm 10$ mm)**

##### 6.4.1 Diseño experimental

Se utilizaron *C. gigas* diploides, de talla entre  $50 \pm 10$  mm, provistos por el laboratorio de producción “Acuicultura Robles SPR de RI”. Los organismos se aclimataron en el Laboratorio Húmedo de Seguridad Biológica (LHSB, CIBNOR) por un periodo de dos semanas, en recipientes plásticos de 10 L con agua de mar filtrada ( $0.45 \mu\text{m}$ ), con flujo de oxígeno, a  $21^{\circ}\text{C}$  y salinidad controlada (34 ups). La dieta consistió de  $0.75 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$  de *I. galbana* libre de bacterias, obtenida del Laboratorio de Alimento Vivo del CIBNOR.

El bioensayo de exposición a *G. catenatum* se realizó en recipientes de 4 L en los que se colocaron dos cedazos de PVC cerrados por un extremo con tela de plástico, que sirvieron como soporte para colocar 10 organismos (en cada uno); en total se colocaron 20 organismos en cada unidad experimental. El bioensayo consistió en un solo tratamiento y dos controles (por triplicado); los ostiones se alimentaron con una mezcla de *I. galbana* ( $2 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>) y *G. catenatum* ( $6 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>), usándose como control no tóxico una dieta de *I. galbana* ( $6 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) y como control tóxico una dieta con sólo *G. catenatum* ( $6 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>). Se realizaron cuatro muestreos: uno en la hora 0 y tres correspondientes a los 1, 3 y 7 días de exposición al dinoflagelado. En cada tiempo de muestreo se colectaron cuatro organismos por réplica; los organismos muestreados de cada unidad experimental se remplazaron por otros (previamente marcados), de forma que el número de organismos en cada unidad experimental se mantuvo constante.

Las muestras fueron procesadas de la siguiente manera: primero se extrajo hemolinfa directamente del pericardio (jeringa de 3 mL) haciendo un pool de hemolinfa por cada réplica y colocándola inmediatamente en hielo. Después las muestras se centrifugaron a 800xg por 5 min, en una centrífuga refrigerada a 4°C y tanto el botón de células como el sobrenadante (plasma) fueron inmediatamente etiquetados y almacenados por separado a -70°C hasta su posterior análisis. Adicionalmente, se tomaron muestras de cuatro tejidos por separado (branquia, gónada, glándula digestiva y músculo), haciendo un pool de tejidos por cada réplica (4 organismos). De estas muestras homogéneas se tomaron 30 mg para llevar a cabo la extracción de RNA y análisis de expresión tejido-específico (solo para glándula digestiva); el resto de los tejidos se almacenaron a -80°C.

Adicionalmente, se evaluó la tasa de aclaramiento (sección 6.3.1), al final solo cambian las unidades, ya que para este bioensayo se reporta TA en  $L h^{-1}$ .

### **6.5 Extracción de ARN total y síntesis de ADN complementario (ADNc)**

Para la extracción del ARN total de las muestras se probaron diferentes kits de extracción: 1) SV Total RNA Isolation System (Promega©,USA), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante (Technical Manual #TM048, [www.promega.com](http://www.promega.com)); 2) Trizol® (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante y, por último, 3) solución AGPC (tiocianato de guanidina acetato de sodio-fenol-cloroformo) o TRI Reagent (Chomczynski y Sacchi, 1987), con reactivos preparados en el laboratorio. Para determinar la cantidad y calidad del ARN extraído, las muestras se leyeron en un espectrofotómetro-UV Nanodrop 2000® (Thermo Scientific) utilizando el coeficiente de la relación de las lecturas de la absorbancia a 260 y 280 nm, considerando como ARN de buena calidad aquellas muestras con un coeficiente de entre 1.8 a 2.1, lo que significa que el ARN no está contaminado; el factor de conversión utilizado fue de  $40 \mu g mL^{-1}$ .

La integridad y pureza del ARN extraído se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% con TBE 1X preparado con agua DEPC. La ausencia de ADN genómico en las muestras de ARN se verificó mediante PCR directo utilizando los oligonucleótidos universales para el gen 28S ribosomal cg28SF, 5'-GCAGGAAAAGAACTAAC-3'; cg28SR, 5'-CCTCTAAGTGGTTTCAC-3'. Para las reacciones de PCR se utilizó como



templado 1  $\mu\text{L}$  de cada muestra de ARN sin diluir (500-1500  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ ), y como control positivo una muestra de ADN complementario de *C. gigas*; el control negativo contenía la mezcla de reacción sin templado.

Una vez verificada la ausencia de contaminación por ADN, se realizó la síntesis de ADNc con el kit First-Strand cDNA Synthesis Reaction (Invitrogen®), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la síntesis se utilizaron 5  $\mu\text{L}$  de ARN a una concentración de 100  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$  (total 0.5  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ ), 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de oligo dT y 0.2  $\mu\text{L}$  (200 U) de transcriptasa reversa.

#### **6.6 Diseño de oligonucleótidos para RT-PCR.**

Se seleccionaron secuencias específicas de *C. gigas* reportadas en el banco de genes (NCBI) para 25 genes implicados en diferentes rutas metabólicas. Para cada gen se diseñó un par de oligonucleótidos utilizando el software DNAMAN®, y se enviaron sintetizar a Sigma-Aldrich Corporation, México. La relación de oligonucleótidos usados en los análisis RT-PCR se muestra en la tabla III.

**Tabla III.** Relación de genes, números de acceso a GenBank de secuencias de cDNA de *C. gigas* utilizados para el diseño de oligonucleótidos para RT-PCR.

<b>Gene</b>	<b>No. acceso</b>	<b>Nombre</b>	<b>Tamaño (pb)</b>	<b>Metabolismo</b>
Glutamina sintetasa	AJ558239	cgGS	402	
Glutación-S-transferasa	CB617406	cgGST	272	
Proteína de estrés térmico 70	AJ305325	cgHSP70	480	
Proteína de estrés térmico 90	EF687776	cgHSP90	491	Proteínas de estrés
Superóxido dismutasa CuZn	AJ496219	cgCuSOD	542	
Peroxidasa melanogénica	CB617557	cgPOXM	450	
ATP-sintetasa subunidad beta	CF369132	cgATPSb	416	
Subunidad P2X4, canal iónico	CB617507	cgP2X4	400	Cadena Respiratoria
Citocromo oxidasa I	AB033687	cgCOI	483	
Proteína p21	CB617437	cgP21	640	
Sub. 1 del ass-factor de p55 cromatina	CB617555	cgCHRAFp 55	500	Regulación de ciclo celular
Factor de elongación 2	CB617558	cgFE2	455	
Inmunolectina B	CB617455	cgIMMLB	542	
LPS y $\beta$ -1,3 glucano	CB617438	cgLPSBP	455	Respuesta inmune
Lectina hepática	CB617560	cgLH	620	
$\beta$ -timosina	CB617380	cgTHYM	455	
Actina (GIA)	AF026063	cgACTN	582	
Actina citoplasmática A3	CF369133	cgACTCA	364	Citoesqueleto
Tubulina $\beta$	CB617442	cgTUB	393	
Lisozima	CB617495	cgLIZ	415	
Tripsina	CB617494	cgTRIP	278	Regulación proteica
Inhibidor de proteasas S/C	CB617554	cgINSERP	432	
Fosfatasa alcalina	CB617556	cgALKP	351	Mantenimiento energético
Glucanasa $\beta$ -1,3	CB617548	cgGLNS	390	
Subunidad ribosomal 28S	AY632555	cg28S	300	CONTROL

## 6.7 Estandarización de las curvas de saturación y análisis de expresión mediante RT-PCR.

Se realizaron reacciones de PCR con los diferentes juegos de oligonucleótidos para establecer el mejor ciclo de amplificación para todas las muestras sin llegar al punto de saturación. Se probaron diferentes ciclos en el programa de amplificación (20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50), en este trabajo se muestran solo 3 ejemplos: *tubulina  $\beta$* , *28S ARNr* y *superóxido dismutasa Cu/Zn*. Para realizar dichas curvas, se tomó 1  $\mu$ L de cada una de las muestras de ADNc para hacer una mezcla; y a partir de esta se tomó 1  $\mu$ l (300 ng) el cual sirvió como ADN molde para las reacciones de PCR.

Para la amplificación de las regiones específicas de los genes blancos, en un tubo Eppendorf de 200  $\mu$ L se colocaron 1 $\mu$ L de ADNc (300 ng), 1  $\mu$ L del oligonucleótido F y 1  $\mu$ L del oligonucleótido R (10 picomoles de cada primer). Aparte, se preparó la mezcla de reacción: por cada reacción se adicionaron 5  $\mu$ L del buffer 10X PCR (Tris-HCl 100 mM pH 8.3, KCl 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 0.01% gelatina), 1  $\mu$ L de dNTPs 10 mM, 0.2  $\mu$ L de Taq polimerasa (5 U/ $\mu$ L) y 39.3  $\mu$ L de agua destilada estéril. La mezcla se homogenizó con micropipeta y se agregaron 47  $\mu$ L de esta mezcla a cada tubo que contenía el ADNc y los oligonucleótidos, para completar un volumen final de 50 $\mu$ L. Finalmente, a los tubos se les dio un pulso en la centrífuga y se colocaron en el termociclador (Corbette Palm Cycler) utilizando las siguientes condiciones de amplificación: desnaturalización inicial a 95°C por 5 min (1 ciclo); desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 45°C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min (35 ó 40 ciclos); extensión final a 72°C por 10 min (1 ciclo).

Los productos de PCR (amplicones) se analizaron en geles de agarosa/Synergel® al 1% en buffer TBE 1X. Se cargaron 10µL de cada amplicon más 1µL del colorante azul de bromofenol (previamente mezclados); la electroforesis se desarrolló en cámaras horizontales (Mini Sub Cell, Biorad) a 80 V durante 1 h. Los geles se documentaron digitalmente en un sistema UVITEC (UVP Inc®) bajo las siguientes condiciones: foco 2, aumento 25X y brillo 0.400. La medición de los niveles de expresión se realizó usando el software UVIDOC V. 97, con el que mediante análisis densitométrico (intensidad de la banda en pixeles) se obtuvieron los datos cuantitativos, reportados como unidades de intensidad relativa para cada uno de los genes analizados.

### **6.8 Diseño de oligonucleótidos para qPCR.**

Para realizar los análisis de qPCR, se diseñaron nuevos oligonucleótidos (Tabla IV) utilizándose las secuencias de *C. gigas* previamente seleccionadas y reportadas en la Tabla III. Para calcular la  $T_m$  (temperatura de hibridación), contenido GC y tamaño del fragmento se utilizaron los softwares primer3 (<http://primer3.ut.ee>) y DNAMAN®. Posteriormente, para corroborar la ausencia de formación de estructuras secundarias, se utilizó el software RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>). Finalmente, para verificar la especificidad a *C. gigas* se realizó el alineamiento de los fragmentos esperados mediante un análisis de homología con las secuencias depositadas en el Gen Bank utilizando el BLASTnt (Basic Local Alignment and Search Tool, NCBI), disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

**Tabla IV.** Relación y características generales de oligonucleótidos diseñados para análisis de RT-qPCR (\* genes candidatos).

Nombre	Secuencia 5'-3'	Gene	Amplicon (pb)	No. acceso GenBank	Tipo de gen
Cg- 28s-Fw*	GGAGTCGGGTTGTTTGAGAATGC	<i>Subunidad ribosomal</i>	114	AY632555	Proteína ribosomal
Cg- 28s-Rv*	GTTCTTTTCAACTTTCCCTCACGG	28S			
Cg- <i>gapdh</i> -Fw*	GTTCAAATATGATTCAACTCACGG	<i>Gliceraldehído3-fosfato deshidrogenasa</i>	109	AJ544886	Metabolismo
Cg- <i>gapdh</i> -Rv*	TGGATCCCGTTCGCAATATACG				
Cg- <i>tub β</i> -Fw*	AGCAGATGTCGTAGAGAGCTTC	<i>Tubulina β</i>	144	CB617442	Citoesqueleto
Cg- <i>tub β</i> -Rv*	TGAACACATTCTCCGTTGTCCC				
Cg- <i>act</i> -Fw*	TACTCTTTCACCACCACAGCCG	<i>Actina</i>	117	AF026063	
Cg- <i>act</i> -Rv*	TAGAGATGAGGATGAAGCAGCAG				
Cg- <i>ef-1α</i> -Fw*	ACCATACAGTGAGGCTCGATTC	<i>Factor de elongación 1-α</i>	138	AB122066	Factor de transcripción
Cg- <i>ef-1α</i> -Rv*	GTGGAAGCCTCAATCATGTTATC				
Cg- <i>p21</i> -Fw	TTCCCATTCTCCCATGTTGTTC	<i>Proteína p21 reguladora del ciclo celular</i>	100	CB617437	Proteínas de regulación del ciclo celular
Cg- <i>p21</i> -Rv	ACAGGCGACATGGATTTAGAAGC				
Cg- <i>cafp55</i> -Fw	TCGAAGATCCCACAAAGCAACAG	<i>Factor 1 de ensamblaje de cromatina sub. p55</i>	77	CB617555	
Cg- <i>cafp55</i> -Rv	TGTCCTTCAACCCCTACAGCGA				
Cg- <i>ef2</i> -Fw	TTGATCACGGCAAGTCTACTCTG	<i>Factor de elongación 2</i>	109	CB617558	
Cg- <i>ef2</i> -Rv	GAGATGGCAGTGGACTTGATGG				
Cg- <i>p53</i> -Fw	CTGTAGTTCTGGCCCGTGAA	<i>Proteína p53</i>	110	AM236465	Apoptosis
Cg- <i>p53</i> -Rv	AAACACAAGGGCACCAACAAG				
Cg- <i>cp1</i> -Fw	ACTACAGAAAGCCGCCGAAT	<i>Caspasa 1</i>	87	HQ425703	Inflamación
Cg- <i>cp1</i> -Rv	GATCATTCTGTGCTACCCCC				
Cg- <i>gst-s</i> -Fw	GACCCAGATGACCCTTACCG	<i>Glutación S-transferasa</i>	71	CB617406	Detoxificación celular
Cg- <i>gst-s</i> -Rv	CCGAAACAACTGAGAGAAGACC				
Cg- <i>cpy450</i> -Fw	ACAGGGACTTCATTGACAGCATG	<i>Citocromo p450</i>	151	EF645271	
Cg- <i>cpy450</i> -Rv	ATTGTGAAACGAGTACTGTCTACC				
Cg- <i>sod-cu/zn</i> -Fw	GACAAAATGATTGACTTGGCCGG	<i>Superóxido dismutasa cu/zn</i>	144	AJ496219	Defensa antioxidante
Cg- <i>sod-cu/zn</i> -Rv	CACTCCACAAGCCAATCGTCCG				
Cg- <i>coi</i> -Fw	GTGTATGTCCTTATTCTTCCAGG	<i>Citocromo C oxidasa I</i>	182	AB033687	Cadena respiratoria
Cg- <i>coi</i> -Rv	GCACGCGTATCAATATCCATTCC				

Cg- <i>tryp</i> -Fw	GCCAGTGACGTAAGACAACCTCG	<i>Tripsina</i>	125	CB617494	Regulación proteica
Cg- <i>tryp</i> -Rv	CAACCATCAACAACGACATTGCC				
Cg- <i>lgbp</i> -Fw	TTGTCCAGTTCTCCCAGCTTCC	<i>Proteína de unión a</i>	108	CB617438	
Cg- <i>lgbp</i> -Rv	GACTACTGGAATGGGATGAAGAAC	<i>LPS y <math>\beta</math>-1,3 glucano</i>			
Cg- <i>cvt</i> -Fw	ATCTCCATCTCCATGACGACG	<i>Cavortina</i>	144	AY256853	Sistema immune
Cg- <i>cvt</i> -Rv	CGATGACAGCGGTATGAGAGG				
Cg- <i>if44</i> -Fw	CATACTGGACGGCAACATACC	<i>Proteína inducida por</i>	109	FJ440108	
Cg- <i>if44</i> -Rv	ATGAATCCTGTCCCCGAGAT	<i>interferón 44</i>			

---

## 6.9 Estandarización de las condiciones para RT-qPCR.

El análisis de la eficiencia es crucial en la cuantificación de la expresión de genes mediante qPCR, dado que esta aproximación está fuertemente influenciada por los componentes de la reacción (Pfaffl, 2004). Las diferencias en la eficiencia de amplificación entre los genes blanco y los de referencia pueden tener un gran impacto en la productividad de la PCR y llevar a errores en cuantificación relativa.

La eficiencia (E) de la PCR en tiempo real se define como la capacidad de la reacción de duplicar el número de copias de las cadenas de ADN o ADNc en cada ciclo (Bustin, 2002; Pfaffl, 2004). La eficiencia de la PCR en tiempo real se calcula a partir de las pendientes de las curvas estándar obtenidas después de realizar diluciones seriadas con las reacciones de la PCR de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$E=10[-1/\text{pendiente}]-1 \quad (4)$$

En esta tesis se determinó la eficiencia de la qPCR para cada uno de los oligonucleótidos de los diferentes genes evaluados: genes de referencia ó controles internos y genes blancos o de interés. A partir de cuatro diluciones seriadas (Tabla V), se construyó una curva estándar para cada uno de los genes de referencia así como para los genes blancos. La amplificación se realizó por triplicado para cada una de las diluciones, utilizando el ADN complementario (mezcla de ADNc de las muestras control y de los tratamientos) de las muestras de los bioensayos con juveniles de *C. gigas* de las dos tallas.

**Tabla V.** Concentraciones de ADNc probadas para las curvas estándar.

Dilución	Factor de dilución	Concentración (ng $\mu\text{l}^{-1}$ )		Templado ( $\mu\text{L}$ )
		Inicial	Final	
1:5	0.04	80	16	5
1:5	0.008	16	3.2	5
1:5	0.0016	3.2	0.64	5
1:5	0.00032	0.64	0.128	5

### 6.10 Determinación de la estabilidad de los genes de referencia candidatos para juveniles de talla pequeña ( $3 \pm 1$ mm).

Algunos de los genes de referencia más utilizados incluyen:  $\beta$ -actina, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hipoxantina guanina fosforibosil-transferasa y 18S del ARN ribosomal. La elección correcta de los genes de referencia para la normalización de la qPCR es esencial. Se ha demostrado que el uso de un solo gen como gen de referencia es susceptible a tener errores en la interpretación de los resultados. En consecuencia, para normalizar el nivel de expresión de los genes es necesario utilizar más de un gen de referencia (Huggett et al., 2005). Por lo tanto, en este trabajo se analizó la estabilidad del nivel de expresión de cinco genes candidatos a utilizarse como genes de referencia (tabla IV). Una vez que fueron determinadas las curvas estándar, dichos genes se corrieron con las muestras del bioensayo con ostiones de talla pequeña expuestos al dinoflagelado durante una exposición aguda (3, 6, 12 y 24 h) y exposición subcrónica (muestras de los día 7 y 14); así como para los ostiones de mayor talla ( $50 \pm 1$  mm) con muestras de los días 1, 3 y 7, utilizando los siguientes componentes por reacción: 1.5  $\mu\text{L}$  de Buffer 10X, 0.75  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50 mM), 0.5  $\mu\text{L}$  de dNTPS (2mM), 0.75  $\mu\text{L}$  de Eva Green (20X) (Biotium, CA), 0.3 U de Taq polimerasa platinum, 1.4  $\mu\text{L}$  de oligonucleótidos (forward y reverse), 5  $\mu\text{L}$  de



ADNc ( $0.64 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  para los ostiones de  $3 \pm 1 \text{ mm}$ , y  $3.2 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  para los ostiones de  $(50 \pm 10 \text{ mm})$  y  $5.8 \mu\text{L}$  de agua miliQ en un volumen final de  $15 \mu\text{L}$ , como control negativo se utilizó agua miliQ.

Para realizar los análisis de estabilidad de los genes de referencia candidatos, los valores de CT o Cq (número de ciclo en el que la curva de fluorescencia atraviesa el umbral de detección establecido) obtenidos para cada uno de los genes, fueron analizados con los programas: NormFinder (Andersen et al., 2004) GeNorm (Vandesompele et al., 2002) y BestKeeper (Pfaffl, 2004) utilizando RefFinder (<http://www.leonxie.com/referencegene.php?type=reference#>). Además, se realizó otro análisis utilizando un macro de excel del programa GeNorm; para este análisis los valores obtenidos de Cq fueron transformadas en cantidades relativas (Q) con un nivel de expresión máximo de 1 mediante la siguiente ecuación:

$$Q = E^{\Delta Cq} \quad (5)$$

$$Q = E^{(\min Cq - \text{sample } Cq)} \quad (6)$$

dónde:

$Q$ = Cantidad de la muestra relativa a la muestra con mayor expresión.

$E$ = Eficiencia de amplificación ( $E = 100\%$ ).

$\min Cq$ : menor valor de Cq= Valor de Cq de las muestras con menor expresión

El cálculo de GeNorm se basa en el principio de que la tasa de expresión de dos genes de referencia ideales es idéntica en todas las muestras independientemente de las condiciones experimentales o tipo de células. Por lo tanto, la variación en la tasa de expresión de dos genes control refleja el hecho de que uno de estos genes no es expresado constantemente con un incremento de la tasa de variación correspondiente al decremento en la estabilidad de expresión reportado como valores de  $M$ , genes con valores más bajos de  $M$  ( $<1.5$ ) tienen la expresión más estable (Vandesompele et al., 2002). Por lo tanto, en GeNorm la estabilidad de expresión del gen ( $M$ ) basada en la tasa de expresión de dos genes (comparaciones en variación) es el criterio más importante para evaluar el gen de referencia.

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

BestKeeper, es un programa que se basa en un análisis de correlación pareada de los genes candidatos (Pfaffl, 2004). BestKeeper estima la correlación del nivel de expresión entre todos los posibles candidatos. Los genes altamente correlacionados son combinados en un

índice. Después de calcularse la correlación pareada entre cada candidato y el índice, se explica la relación entre el índice y la contribución del gen candidato.

Una vez optimizadas las condiciones para el PCR tiempo real (mezclas de reactivos, la concentración de los primers, concentración del marcador fluorescente y la concentración de la muestra), así como los genes de referencia que se van a utilizar, se continuó con la cuantificación de la expresión de los genes blanco.

### **6.11 Análisis cuantitativo de expresión génica**

Para llevar a cabo todas las reacciones de qPCR, se utilizaron los siguientes componentes por reacción: 1.5  $\mu\text{L}$  de Buffer 10x, 0.75  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50 mM), 0.5  $\mu\text{L}$  de dNTPS (2mM), 0.75  $\mu\text{L}$  de Eva Green (20X) (Biotium, CA), 0.3 U de Taq polimerasa platinum, 1.4  $\mu\text{l}$  de oligonucleótidos (forward y reverse), 5  $\mu\text{l}$  de ADNc y 5.8  $\mu\text{L}$  de agua miliQ en un volumen final de 15  $\mu\text{L}$ , como control negativo se utilizó agua miliQ. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 10 min a 95°C; seguidos de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 s, de elongación a 65°C por 1 min y de polimerización a 75°C por 5 s. Por último se realizó una curva de disociación de 65°C a 95°C con un incremento de temperatura de 1°C cada 10 s. A partir de las curvas de disociación se revisó que la amplificación de los genes mostrara un producto único y específico visualizado como un solo pico.

## **6.12 Determinación de la estabilidad de los genes de referencia candidatos tejido-específico (glándula digestiva y hemocitos) en juveniles ( $50 \pm 10$ mm) de *C. gigas*.**

Se realizaron las reacciones de qPCR por triplicado, para las muestras de glándula digestiva y hemocitos (la estandarización de las curvas de calibración se describe detalladamente en el apartado 4.8.1). Los análisis de estabilidad de los genes de referencia se realizaron como se describe en el apartado 4.8.2. Además, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía como análisis complementario a los programas utilizados. Una vez que se determinó el gen de referencia a utilizar, se realizaron los análisis cuantitativos de transcritos de los genes de la glándula digestiva involucrados en:

Regulación del ciclo celular:

Proteína p21 (*p21*)

Factor 1 de ensamblaje de cromatina sub. p55 (*cafp55*)

Factor de elongación 2 (*ef2*)

Inflamación y apoptosis,

Caspasa 1 (*casp 1*)

Proteína p53 (*p53*)

Citoesqueleto,

Actina (*act*)

Tubulina  $\beta$  (*tub  $\beta$* )

En hemocitos, los genes involucrados en:

Respuesta inmune y estrés,

Cavortina (*cvt*)

Proteína inducida por interferón 44 (*if44*)

Proteína de unión a LPS y  $\beta$ -1,3 glucano (*lgbp*)

HSP70 (*hsp70*)

### **6.13 Análisis histológico en juveniles de *C. gigas* ( $3 \pm 1$ mm) y ( $50 \pm 10$ mm)**

Para la determinación de las alteraciones morfológicas, se tomó un organismo por tratamiento/réplica al final del periodo de exposición (14 días) para los juveniles de talla pequeña ( $3 \pm 1$  mm) y se fijaron en solución Davidson (Shaw y Battle, 1957 citado en Howard y Smith, 1983) por 48 h, después se conservaron en etanol al 70% hasta su posterior análisis. Además, se tomaron muestras de juveniles de mayor talla ( $50 \pm 10$  mm) al día 7, se les retiró la concha y los organismos completos fueron envueltos en tela de gasa e inmediatamente se fijaron en solución Davidson (Shaw y Battle, 1957 citado en Howard y Smith, 1983) por 48 h, después se conservaron en etanol al 70% hasta su posterior análisis. Los ostiones de talla pequeña, antes de realizar los cortes histológicos, se descalcificaron con una solución de citrato de sodio y ácido fórmico (Elston, 1999).

Para llevar a cabo las observaciones histológicas las muestras fueron deshidratadas en una serie progresiva de etanol al 70, 80, 95 y 100 %, aclaradas en xileno y posteriormente incluidas en parafina (Paraplas X-Tra). Se realizaron 6 cortes transversales de los organismos completos para observar el daño provocado por la exposición al dinoflagelado tóxico de cada replica por tratamiento; los cortes fueron preparados en secciones de 5  $\mu$ m de grosor, utilizando un micrótopo rotatorio (Leica RM 2155, Leica Microsystems). Finalmente, los cortes fueron montados en portaobjetos de vidrio y teñidos por 5 min con hematoxilina de Harry y 12 min con eosina (Martoja y Martoja-Pierson,

1967). Las láminas fueron examinadas bajo un microscopio de luz (Olympus BX41) para observar las lesiones en los tejidos.

#### 6.14 Análisis estadísticos

Se calcularon los promedios y desviación estándar de los datos de las concentraciones de *G. catenatum*, y fueron transformados a logaritmo base 2 para obtener la tasa de crecimiento (número de divisiones día<sup>-1</sup>) y el tiempo de duplicación, con base en la fórmula:

$$m = (\text{Log}_2 B_n - \text{Log}_2 B_o) / (t_n - t_o) \quad (7)$$

El efecto de *G. catenatum* en las tasas de aclaramiento de *C. gigas* se evaluó utilizando la prueba t-student para muestras independientes, con un nivel de significancia  $p < 0.05$ , entre las tasas de aclaramiento de los ostiones expuestos y los controles.

La estrategia de cuantificación utilizada para el análisis de la expresión génica por RT-qPCR fue la de cuantificación relativa. Los cálculos en cuantificación relativa se basan en la comparación de los valores Ct utilizando la eficiencia de la reacción de la PCR como factor de corrección. Sin embargo, hay un modelo que no requiere la eficiencia de la reacción para acceder a un factor de corrección, dicho modelo supone una eficiencia óptima e idéntica (correspondiente al 100%) en la eficiencia de reacción en la PCR tanto del gen en estudio como del gen de referencia (Livak y Schmittgen, 2001). En este trabajo se utilizó el método de  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , debido a que en este método no se requiere la eficiencia de reacción

como factor de corrección, y expresa la proporción obtenida de la relación entre los valores Ct de la muestra y los valores Ct del control (Pfaffl, 2001), mediante las siguientes ecuaciones:

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-[\Delta\text{Ct muestra} - \Delta\text{Ct control}]} \quad (8)$$

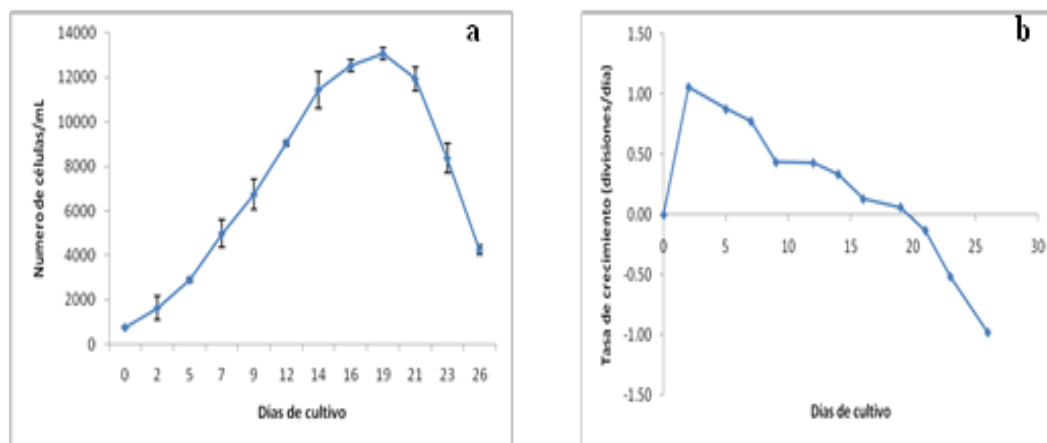
$$\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} \quad (9)$$

Con este método no es necesario realizar curvas estándar en cada corrida, cada muestra es ajustada a la cantidad de templado que se utilizó, por comparación relativa con los genes de referencia. Estos valores son entonces normalizados relativamente a un tratamiento calibrador, este puede ser el control (no tratado), muestras, tiempo o tejido; en el presente estudio se utilizó como calibrador las muestras de ostiones alimentados con *I. galbana* (control negativo a toxinas). Se realizaron ANOVAs de dos vías para cada gen, tratamiento y tiempo de exposición, después de probar los supuestos de distribución de normalidad de los datos (prueba de Kolmogorov smirnov) y homogeneidad de varianzas (prueba de Levene); se hicieron pruebas *a posteriori* para encontrar las diferencias significativas, utilizando la prueba de comparación múltiple de Fisher (LDS). En todos los casos se usó una significancia estadística de  $p < 0.05$  Statistic 8.0 (StatSoft, Tulsa, OK).

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Curva de crecimiento de *G. catenatum*

En la figura 1a se muestra la curva de crecimiento obtenida para *G. catenatum* en medio f/2. La máxima concentración celular se registró entre los días 17 y 19 de cultivo; después del día 21 de incubación el cultivo entró en fase de muerte acelerada por lo que el conteo celular disminuyó considerablemente. La tasa de crecimiento ( $\mu$ , número de divisiones celulares día<sup>-1</sup>) más alta se registró a las 48 h de incubación (día 2) y disminuyó lentamente al avanzar la edad del cultivo (fig. 1b). De acuerdo a la gráfica, en el día 19 termina la fase exponencial e inicia la fase de muerte celular, prácticamente no existe una fase estacionaria como tal. Estos parámetros fueron importantes para determinar el tiempo de cosecha de las microalgas (estado fisiológico óptimo/mayor rendimiento de biomasa), para preparar las mezclas con el número de células apropiado para los bioensayos.



**Figura 1.** Parámetros de crecimiento de *G. catenatum* (en medio f/2 + Se, a 22 °C 35 ups y 150  $\mu\text{Em}^2\text{s}^{-1}$ ). Panel **a**, curva de crecimiento; panel **b**, tasa de crecimiento (divisiones/día).



## 7.2 Observaciones generales del bioensayo con ostiones juveniles

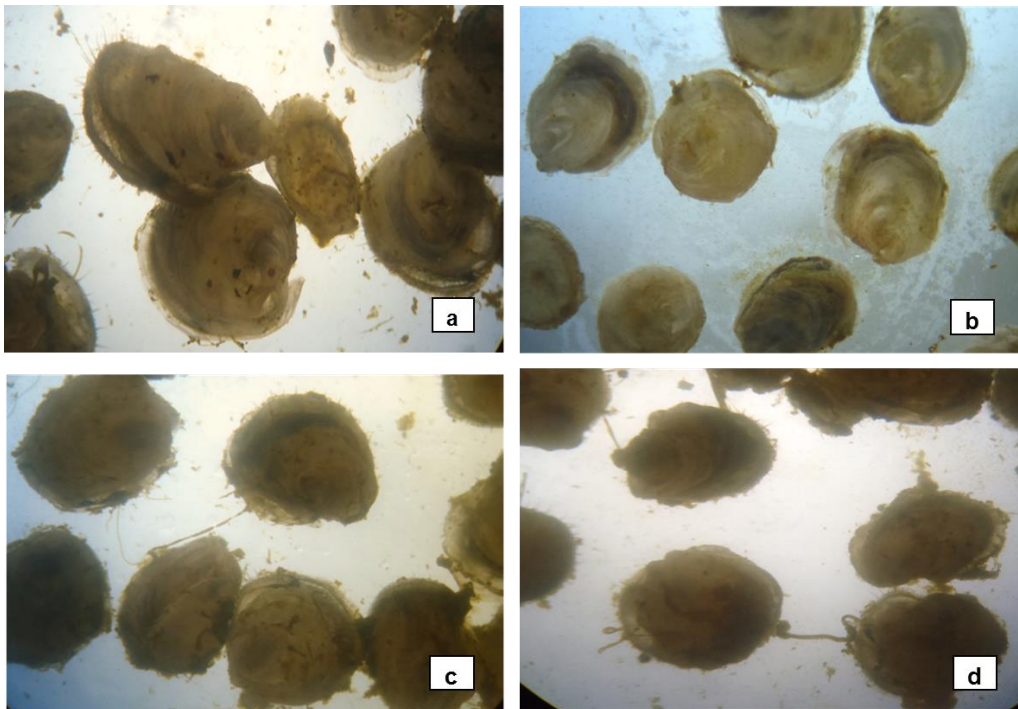
### 7.2.1 *C. gigas* de $3 \pm 1$ mm

En los organismos alimentados con *I. galbana*, el comportamiento fue normal (Fig. 2a) no se observó respuesta fisiológica adversa como: cese de la alimentación, retracción de manto, producción de pseudoheces; por el contrario, la eficiente remoción de la microalga de las unidades experimentales y formación de heces, fueron características del buen estado de salud de los organismos hasta el final del experimento. Alrededor de 8h después de haberles proporcionado el alimento, ya habían removido casi el 100 % de las células (fig. 2a). No se presentó mortalidad en ninguna de las réplicas de los tratamientos y el control.

El ostión del Pacífico expuesto a células de *G. catenatum* mostró cambios en su comportamiento alimenticio después de su exposición al dinoflagelado tóxico. Estos cambios consistieron en el cierre parcial y/o total de valvas, producción de pseudoheces (partículas de alimento no digerido envuelto en mucus) y moco, retracción del manto (no se observaron los cilios que lo rodean) (fig. 2b, c y d), así como una disminución de la capacidad de filtración, reportada como disminución en la tasa de aclaramiento (fig. 3).

Estos cambios se observaron después de 3 h de exposición a las células tóxicas en los ostiones alimentados con las dietas mixtas de *I. galbana* + *G. catenatum*  $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> y  $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>. En los ostiones alimentados con el control tóxico (fig. 2b) y la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum*  $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> (fig. 2c) los organismos iniciaron la producción de pseudoheces en cantidades mínimas, este comportamiento continuó hasta las

12 h de exposición. Sin embargo, en los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum*  $30 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$  los organismos permanecieron cerrados por más tiempo ( $> 3 \text{ h}$ ), algunos se mantuvieron cerrados hasta las 6 h de exposición y a partir de entonces iniciaron la producción de pseudoheces, que fue mayor (fig. 2d), continuando aún después de 12 h de exposición.



**Figura 2.** Juveniles de *C. gigas* de  $3 \pm 1 \text{ mm}$  alimentados con *I. galbana* control negativo a toxinas PST ( $0.75 \times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$ ) (a), con *G. catenatum* control positivo a toxinas PST ( $3 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$ ) (b), con dieta mixta *I. galbana* + *G. catenatum*  $3 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$  (c), con dieta mixta *I. galbana* + *G. catenatum*  $30 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$  (d).

### 7.2.2 *C. gigas* de $50 \pm 10 \text{ mm}$

En el bioensayo de exposición de organismos de  $50 \pm 10 \text{ mm}$  de talla a la microalga tóxica, los ostiones juveniles de mayor talla también mostraron cambios en su comportamiento alimenticio después de la primera exposición a *G. catenatum*. Durante las

dos horas siguientes al inicio del bioensayo, los organismos mostraron un cierre parcial de valvas con la dieta mezclada de *I. galbana* + *G. catenatum* ( $6 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) y con la dieta de sólo *G. catenatum* (control tóxico). Además, al igual que en los ostiones juveniles de menor talla también se observó la producción activa de pseudoheces tanto en la dieta mixta *I. galbana* + *G. catenatum* ( $6 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) como en el control tóxico durante las primeras 6 h, después los organismos comenzaron a filtrar el alimento normalmente. Los ostiones alimentados únicamente con *I. galbana* (control no tóxico) mostraron un comportamiento de filtración normal removiendo la microalga durante todo el bioensayo.

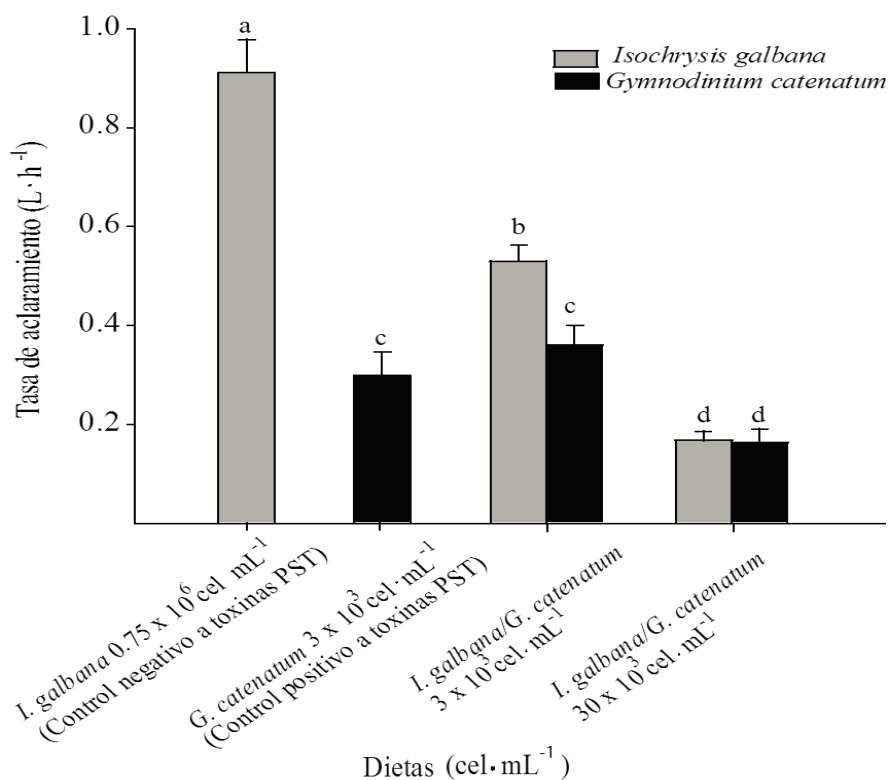
### 7.3 Tasas de aclaramiento (TA) de *C. gigas*

#### 7.3.1 TA de ostiones de $3 \pm 1$ mm

La tasa de aclaramiento (TA) de *C. gigas* disminuyó significativamente ( $F = 74.8$ ,  $p = 0.0$ ) en los dos tratamientos que consistieron en la mezcla de las dos microalgas: *I. galbana*  $0.75 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup> y *G. catenatum* ( $3 \times 10^3$  y  $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>), así como en los ostiones alimentados únicamente con *G. catenatum*  $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> (control tóxico).

Como se observa en la figura 3, la tasa de aclaramiento mantiene una relación directa con la concentración de células del dinoflagelado. Esta tasa disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) con los dos tratamientos probados y el control tóxico, observándose el mayor efecto en la dieta mixta con  $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> de *G. catenatum* ( $0.24 \pm 0.08$ ). Por ello, los organismos no removieron completamente el alimento de las unidades experimentales durante cada periodo de 24 h. El control positivo o control tóxico (solo *G. catenatum*), nos

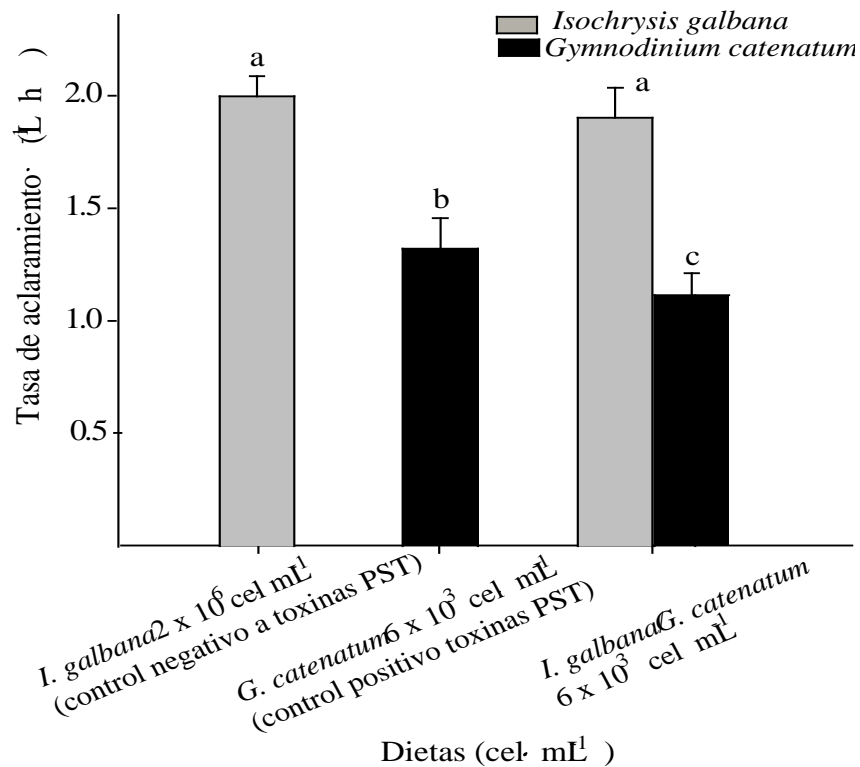
permitió confirmar que los organismos ingieren al dinoflagelado en esta condición, aunque la TA es baja (fig. 3). Por otro lado, en relación a *I. galbana* aunque se utilizó el mismo número de células en los dos tratamientos y el control, al final del monitoreo de 24 h se encontró que *C. gigas* no alcanzó a remover toda la microalga en los tratamientos que contenían al dinoflagelado, disminuyendo significativamente la TA ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, la TA de los ostiones alimentados con *I. galbana* fue alta (0.96), lo que significa que los organismos removieron casi el 100 % en un periodo de 24 h. Estos resultados demuestran que el ostión ingirió al dinoflagelado y no seleccionó la ingestión de partículas dependiendo de su talla.



**Figura 3.** Tasa de aclaramiento (TA) de *C. gigas* de  $3 \pm 1$  mm durante 24 h. Control negativo, *I. galbana*  $0.75 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>; Control positivo, *G. catenatum*  $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>. Tratamientos: dieta mixta *I. galbana* ( $0.75 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>) y *G. catenatum* ( $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>); dieta mixta *I. galbana* ( $0.75 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>) y *G. catenatum* ( $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>).

### 7.3.2 TA de ostiones de $50 \pm 10$ mm

La TA en ostiones de mayor talla, también fue alterada tanto en una exposición unialgal (sólo *G. catenatum*) como en una dieta mixta. En la figura 4 se muestran las TA de *C. gigas* bajo diferentes dietas después de 24 h de exposición. Los organismos alimentados sólo con *I. galbana* (control negativo) mostraron una TA de  $2 \pm 0.10$ , lo que significa que removieron casi el 100 % de *I. galbana*; la TA de *I. galbana* en los ostiones alimentados con la dieta mixta *I. galbana* + *G. catenatum* ( $6 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) disminuyó a  $1.9 \pm 0.11$ . Este comportamiento de disminución de la TA también se observó en los ostiones alimentados con sólo el dinoflagelado (control tóxico)  $6 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> mostraron una TA significativamente baja de  $1.32 \pm 0.14$ ; mientras que en los organismos con la dieta mixta (*I. galbana* + *G. catenatum*  $6 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) la TA para *G. catenatum* también es baja de  $1.11 \pm 0.13$  ( $p < 0.05$ ). Es importante destacar que la TA del control tóxico fue similar a la de la dieta mixta. Los ostiones alimentados con el dinoflagelado (control tóxico y tratamientos) mostraron una baja actividad de alimentación en comparación con los alimentados con la microalga no tóxica (fig. 4). A las 24 h, los ostiones alimentados con *I. galbana* habían consumido por completo a las microalgas, mientras que los alimentados con dinoflagelados tóxicos no; no se registró muerte de organismos en las condiciones experimentales empleadas.



**Figura 4.** Tasa de aclaramiento (TA) de *C. gigas* de  $50 \pm 10$  mm durante 24 h. Control negativo, *I. galbana* ( $2 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>); Control positivo, *G. catenatum* ( $6 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>); dieta mixta *I. galbana* ( $2 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>) + *G. catenatum* ( $6 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>).

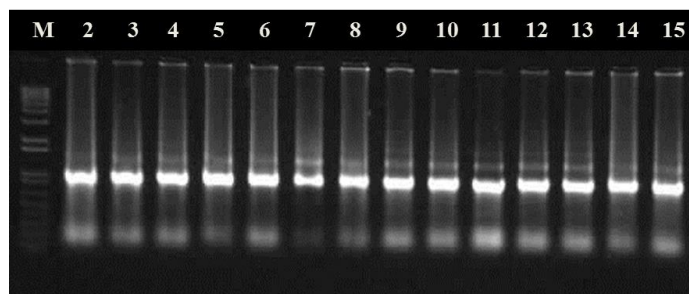
#### 7.4 Extracción de ARN total

Para la estandarización de la técnica de extracción de ARN total se probaron tres métodos: 1) SV Total RNA Isolation System, 2) Trizol® y 3) AGPC (Chomczynski y Sacchi, 1987). En las tablas VI y VII, se muestran los resultados y los criterios evaluados (respectivamente) para seleccionar el método de extracción utilizado, que finalmente fue el AGPC. En la figura 5 se muestra un gel de agarosa al 1% en TBE 1X (DEPC), en el que se puede observar la calidad e integridad del ARN obtenido. En ninguna muestra se observaron signos de degradación, y el análisis electroforético permitió identificar las

bandas de ARN correspondientes a las subunidades ribosomales. De este modo, considerando que la subunidad ribosomal 28S del ostión tiene una proporción de 2:1.5 con respecto a la subunidad 18S, se considera que el ARN obtenido es de excelente calidad.

**Tabla VI.** Criterios de evaluación de las metodologías de extracción de ARN total probadas.

<b>Criterios de evaluación</b>	<b>Trizol (Invitrogen®)</b>	<b>SV Total RNA Isolation System (Promega©,USA)</b>	<b>Solución AGPC o TRI Reagent</b>
Eficiencia	Alta	baja	alta
Contaminación con ADN	Baja	alta	Nula
Pureza	Intermedia	baja	Alta
Concentración	Alta	baja	Alta
Degradación	Baja	alta	Nula



**Figura 5.** Perfil electroforético en gel de agarosa al 1% con TBE 1X de muestras de ARN total obtenidas mediante el método AGPC (Chomczynski y Sacchi, 1987). Líneas: 1, marcador de peso molecular (1 Kb plus Ladder); 2-15 muestras de ARN total del bioensayo de exposición aguda de *C. gigas* a *G. catenatum* aleatoriamente seleccionadas. Técnica de tinción: EtBr; condiciones de separación, 80 V, 45 min.

**Tabla VII.** Concentración y pureza del ARN total de las muestras obtenidas del bioensayo de exposición aguda de *C. gigas* a *G. catenatum*.

Tiempo de exposición (h)	Tratamientos	RNA (ng/μl)	Abs 260/280	Abs 260/230
0	CN	1236 ± 1061	2.1	1.8
0	CP	1247 ± 900	2.0	1.8
0	D1	1451 ± 868	2.1	1.9
0	D2	858 ± 82	2.1	2.0
3	CN	498 ± 70	2.0	1.8
3	CP	599 ± 139	1.9	1.8
3	D1	594 ± 36	2.0	1.9
3	D2	507 ± 16	2.0	1.8
6	CN	397 ± 51	2.0	1.8
6	CP	440 ± 148	2.1	1.8
6	D1	486 ± 231	2.0	2.1
6	D2	412 ± 205	2.0	2.1
12	CN	899 ± 275	1.9	1.9
12	CP	697 ± 231	2.0	1.9
12	D1	531 ± 67	2.0	1.8
12	D2	779 ± 209	1.9	1.8
24	CN	492 ± 152	1.9	1.8
24	CP	630 ± 102	1.8	1.8
24	D1	642 ± 101	1.9	1.8
24	D2	610 ± 86	1.9	1.8

Notación: CN: Control no tóxico, *I. galbana*  $0.75 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>; CP: Control tóxico, *G. catenatum*  $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>. D1: dieta mixta *I. galbana* ( $0.75 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>) y *G. catenatum* ( $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>); D2: dieta mixta *I. galbana* ( $0.75 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>) y *G. catenatum* ( $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>).

Por otro lado, se comprobó la ausencia de contaminación con ADN en todas las muestras, al realizar reacciones de PCR directas usando el ARN como templado y los oligonucleótidos universales para el gen 28S. Como se muestra en la figura 6, las reacciones realizadas bajo estas condiciones (ARN como templado) y sin templado (control negativo) no rindieron ningún producto de PCR (líneas 2, 4-8), a diferencia del control positivo (línea 3) en el que se usó como templado ADNc de *C. gigas*.





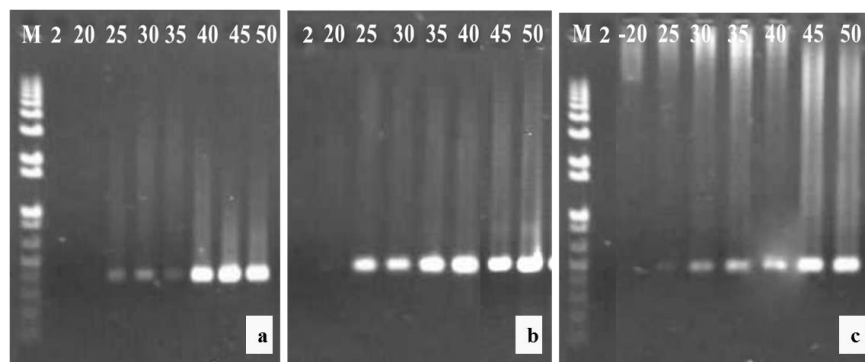
**Figura 6.** Perfil electroforético en gel de agarosa/Synergel al 1% en TBE 1X de productos de PCR del gen 28S ARNr obtenidos en la prueba de identificación de contaminación con ADN del ARN de *C. gigas* extraído mediante el método AGPC (Chomczynski y Sacchi, 1987). Líneas: 1, marcador de peso molecular (1 Kb plus Ladder) 2, control negativo (sin templado); 3, control positivo ADNc de *C. gigas*; 4-7, muestras de ARN total. Técnica de tinción: EtBr; condiciones de separación, 80 V/45 min.

Una vez que se verificó la ausencia de ADN en las muestras de ARN total, se sintetizó el ADN complementario (ADNc); la eficiencia de síntesis fue alta obteniéndose concentraciones entre los 2,300 y 2,500 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ . El ADNc sintetizado se usó para hacer los análisis RT-PCR, con la finalidad de evaluar la expresión de los 25 genes propuestos.

### 7.5 Estandarización de las curvas de saturación y análisis de expresión mediante RT-PCR.

Las curvas de saturación llevadas a cabo para los análisis preliminares realizados mediante PCR punto final de todos los genes, permitieron identificar el ciclo, para programar la reacción de PCR, en el que la amplificación no alcanza la meseta de saturación, así como identificar aquellos genes que no mostraron expresión bajo las condiciones probadas. Cabe mencionar que los genes evaluados mostraron valores de saturación (mesetas) diferentes. En la figura 7 se muestran ejemplos de las curvas de

saturación obtenidas de tres genes evaluados: a) tubulina  $\beta$  (*tub*); b) 28S ARN ribosomal (28s ARNr); y c) superóxido dismutasa tipo cobre/zinc (*sod-cu/zn*).



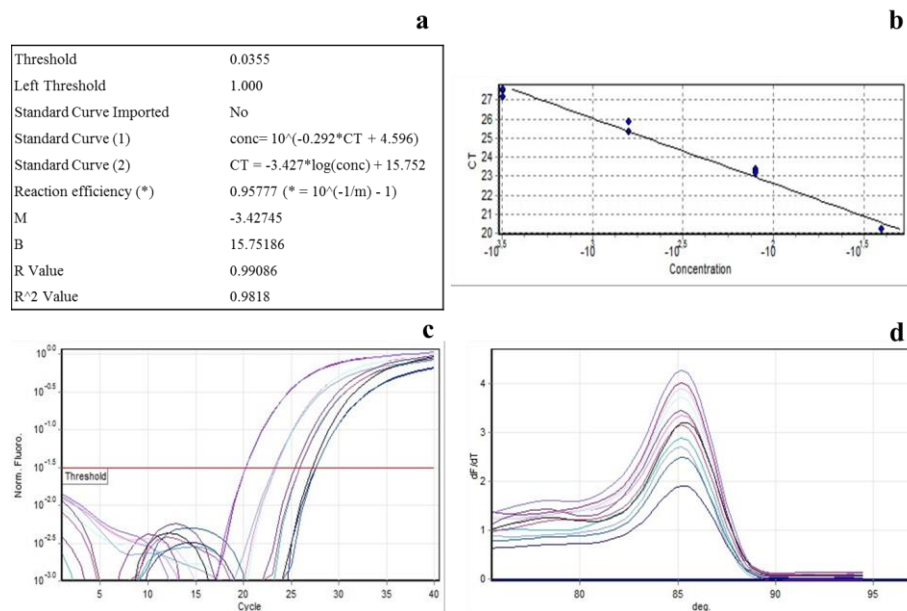
**Figura 7.** Perfil electroforético en gel de agarosa/Synergel® TBE al 1% de amplicones obtenidos en experimentos de saturación de PCR punto final para la evaluación de oligonucleótidos gen-específicos. Líneas: 1, marcador de peso molecular (1 Kb plus Ladder, Invotrogen); 2, (control negativo, sin templado); 20-50, ciclos de amplificación. Paneles: a, tubulina- $\beta$ ; b, 28S ARNr ribosomal; c, superóxido dismutasa tipo cobre/zinc. Técnica de tinción: EtBr; condiciones de separación, 80 V/1 h.

De los 25 genes analizados en juveniles de *C. gigas* de  $3 \pm 1$  mm bajo las condiciones de ensayo (agudo y subcrónico), se observó la amplificación solo en 16 de ellos, mientras que en los ocho genes restantes no se logró observar producto de síntesis en ningún tratamiento, dichos genes fueron: *hsp90*, *immunolectina B*, *lectina hepática*,  $\beta$ -*timosina*, *lisozima*, *inhibidor de proteinasas (Ser o Cys)*, *fosfatasa alcalina* y *glucanasa  $\beta$  1-3*. Las gráficas del análisis de estos experimentos exploratorios del comportamiento de *C. gigas* a la exposición al dinoflagelado tóxico (por RT-PCR), se muestran en los anexos I y II. Con base en estos resultados, se realizó una selección de los 16 genes que se sobreexpresaron o reprimieron, así como los tratamientos y tiempos de exposición en los que se observó una mayor repuesta; estos genes seleccionados fueron considerados para los análisis de expresión mediante qPCR (los análisis se detallan en la sección 5.5.2).

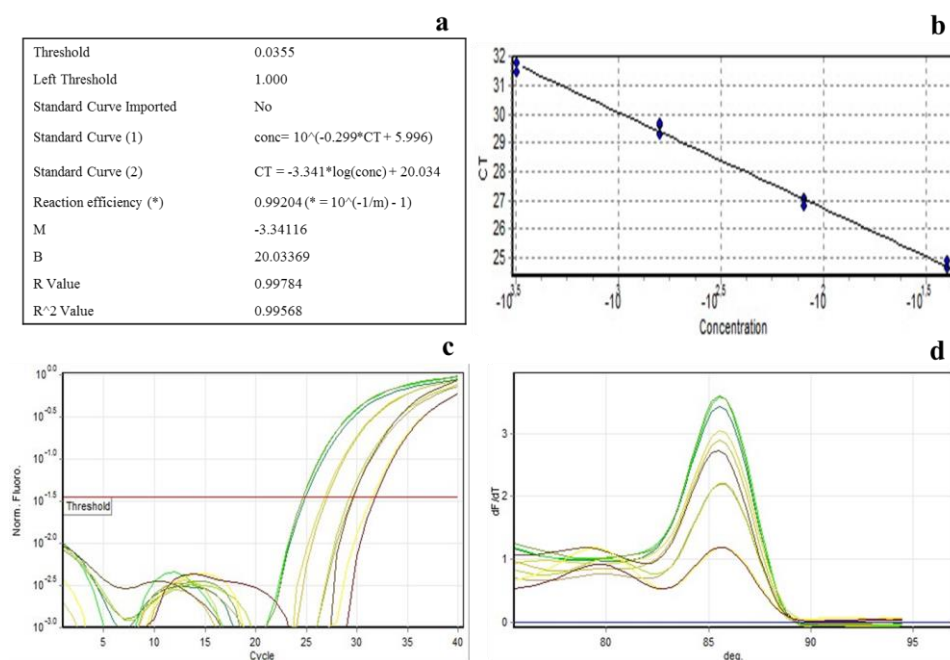
## 7.6 Estandarización de la eficiencia de amplificación

Para determinar y estandarizar la eficiencia de amplificación en los análisis de expresión, se realizaron curvas estándar de los oligonucleótidos correspondientes a los 16 genes previamente seleccionados por RT-PCR y para otros tres genes involucrados en el sistema inmune. Las figuras 8 y 9 corresponden a ejemplos de las curvas estándar realizadas para cada uno de los genes analizados, y en estos casos en particular, para un gen de referencia (fig. 8) y un gen blanco (fig. 9).

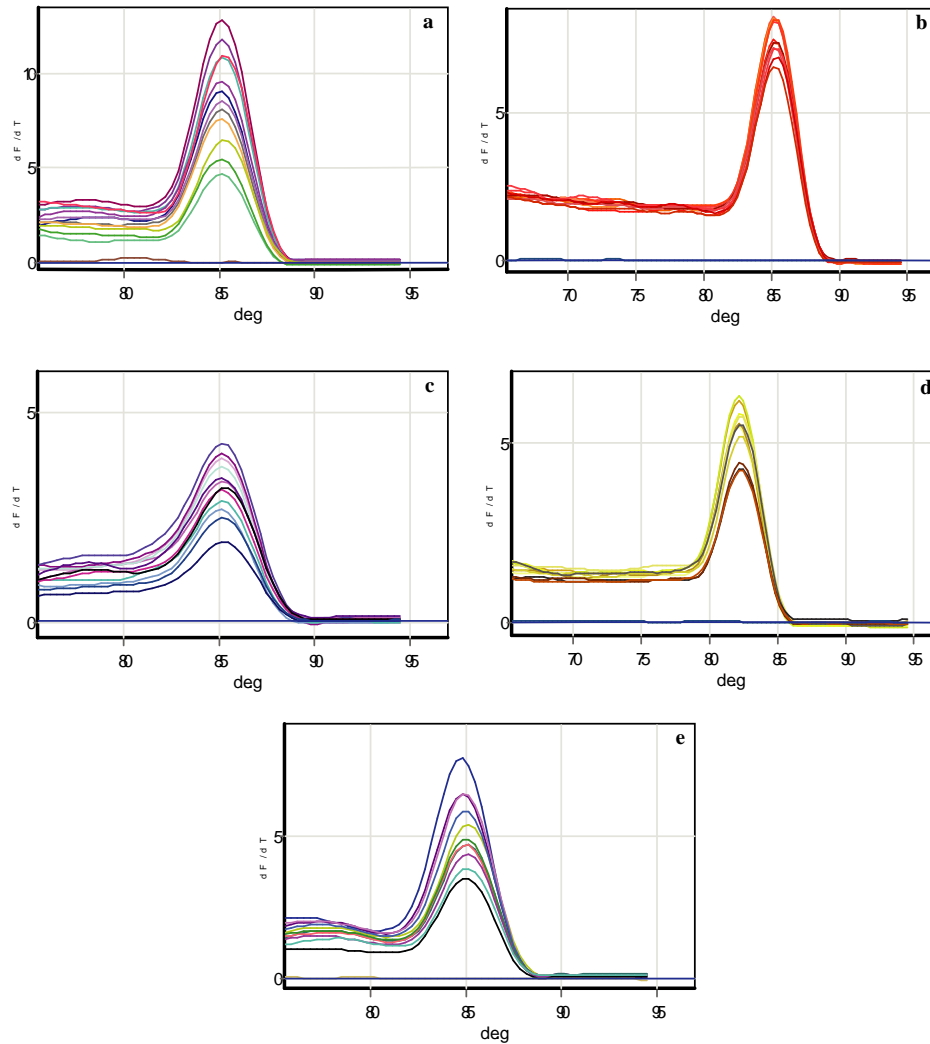
Los valores de Ct se distribuyeron entre 22.5 (28s) y 28.29 para el gen de la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (*gapdh*), estos fueron menores que uno entre las repeticiones. Las curvas estándar exhibieron coeficiente de correlación ( $R^2$ ) mayores a 0.98 y la eficiencia del qPCR varió de 95% a 100%. La especificidad de la amplificación de cada uno de los primers fue confirmada por el análisis de las curvas de disociación, las cuales mostraron un único producto durante la corrida de qPCR. En la fig. 10 se muestran las temperaturas de fusión de los genes de referencia que esta entre 82 y 85 °C. Además, los análisis electroforéticos mediante gel de agarosa/synergel® también mostraron una sola banda para todos los genes amplificados.



**Figura 8.** Curva estándar para el gen de referencia candidato actina (*act*). Paneles: **a)** valor umbral y eficiencia de amplificación, **b)** regresión lineal, **c)** curva de fluorescencia y **d)** curva de disociación en ostiones de  $3 \pm 1$  mm de talla.



**Figura 9.** Curva estándar para el gen blanco *lps- $\beta$  1,3 glucano* (*lbp $\beta$* ). Paneles: **a)** valor umbral y eficiencia de amplificación, **b)** regresión lineal, **c)** curva de fluorescencia y **d)** curva de disociación en ostiones de  $3 \pm 1$  mm de talla.



**Figura 10.** Curvas de disociación de (a) *tub β*, (b) *ef1-α*, (c) *act*, (d) *gapdh* y (e) *28s ARNr*.

### 7.7 Determinación de la estabilidad de los genes de referencia candidatos en juveniles de $3 \pm 1$ mm de *C. gigas*

Se determinó la estabilidad de la expresión de cinco genes de referencia (*tub β*, *ef1-α*, *act*, *gapdh* y *28s ARNr*) midiendo los niveles de expresión de ARN en muestras de ostión (organismos completos). Para cada muestra, se calculó la estabilidad de la expresión de cada gen utilizando la media geométrica de los valores Ct. Para realizar los análisis con el algoritmo GeNorm, los valores ct fueron convertidos a cantidades relativas, utilizando el método del Ct comparativo, mientras que para los análisis con el programa NormFinder,

fueron transformados a logaritmo natural. Por otro lado, para los análisis con el algoritmo BestKeeper, los valores ct fueron usados directamente.

#### 7.7.1 Análisis GeNorm

Con este programa se realizaron dos análisis: primero utilizando la macro de Excel del programa de GeNorm (Vandesompele et al. 2002), los valores de los ct fueron convertidos a cantidades relativas, aplicando la fórmula del método del Ct comparativo, posteriormente, estos valores fueron introducidos en el programa para llevar a cabo el análisis. La estabilidad de la expresión (M) de cada gen de referencia candidato evaluado se muestra en la figura 11. Un valor de M bajo indica una expresión muy estable de ese gen bajo las condiciones del ensayo. Los genes con los valores de M más bajos y, por lo tanto, los más estables fueron: *28s ARNr* y *gapdh* con un valor de  $M=0.08$ . Los valores de M arriba de 1.5 indican que los genes son altamente variables en las condiciones probadas, por lo tanto, no podrían utilizarse como genes de referencia. Además, el programa GeNorm también determina el número óptimo de genes de referencia que se pueden usar, mediante el cálculo de la variación pareada (V) entre los genes candidatos. Dicho factor es obtenido por el análisis de los cambios en el factor de normalización, por la adición sucesiva del gen de referencia candidato más estable (NFN y NFN+1). Los análisis de variación para estos genes arrojaron valores de 0.095 para V<sub>2/3</sub>, 0.096 para V<sub>3/4</sub> y 0.090 para V<sub>4/5</sub> (fig. 12). Una variación grande indica que el gen añadido tiene un efecto significativo y debe ser incluido para el cálculo de un factor de normalización confiable. En nuestro caso, se pudo observar un pequeño incremento en el valor de V<sub>3/4</sub>, que no fue significativo al añadir el tercer gen, por lo tanto, no fue necesario que el factor de normalización considerara tres

genes de referencia. Una variación mayor a 0.15 indica que el gen o genes no pueden utilizarse como genes de referencia solos, sino que tendría que incluir otros genes para conseguir un factor de normalización correcto y así disminuir el error de cuantificación.

El segundo análisis que se realizó fue utilizando los datos de ct sin transformar a cantidades relativas, estos fueron directamente introducidos como valores de ct utilizando también el programa de GeNorm en la página web: RefFinder (<http://www.leonxie.com/referencegene.php?type=reference#>) (fig. 13 a).

Los genes con los valores de M más bajos y, por lo tanto, los más estables también fueron: *28s ARNr* y *gapdh* con un valor de  $M = 1.31$ .

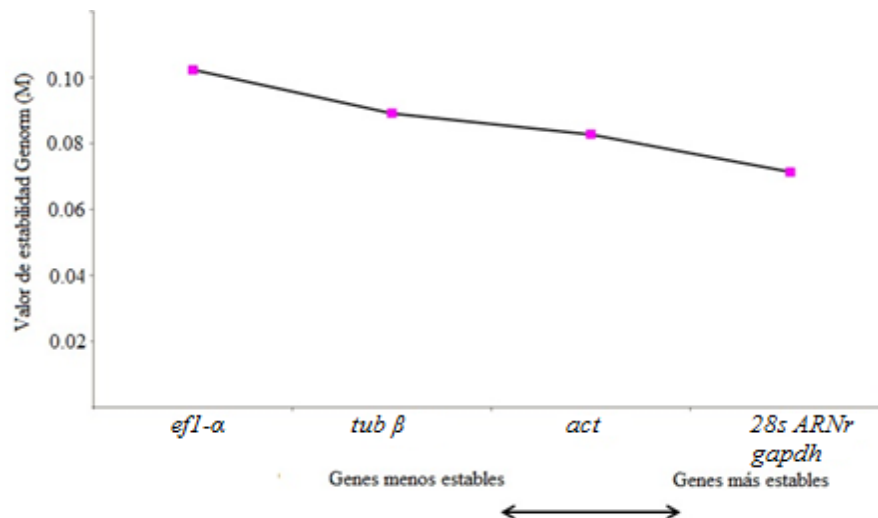
#### 7.7.2 Análisis NormFinder

Para realizar este análisis también se probó un macro del programa en Excel, con el que los datos fueron transformados a logaritmo natural, y la variación entre grupos se midió al asignar categorías a las muestras (según el tratamiento y tiempo de exposición), de forma que el gen más estable sería aquel cuyos valores se distribuyan más cercanamente a cero (también se realizó un análisis a través de la página web de Redfinder). Los resultados entre estos dos métodos coincidieron, por tal razón en este documento solo se presenta la gráfica de estabilidad que mostró Redfinder. Los genes con menor variación fueron: *gapdh* (0.77) y *tub  $\beta$*  (1.24). Por lo tanto, los resultados de NormFinder mostraron que el mejor par de combinaciones de genes de referencia fue *gapdh* y *tub  $\beta$*  con un valor de 0.003 (Fig. 13a).

### 7.7.3 Análisis de BestKeeper

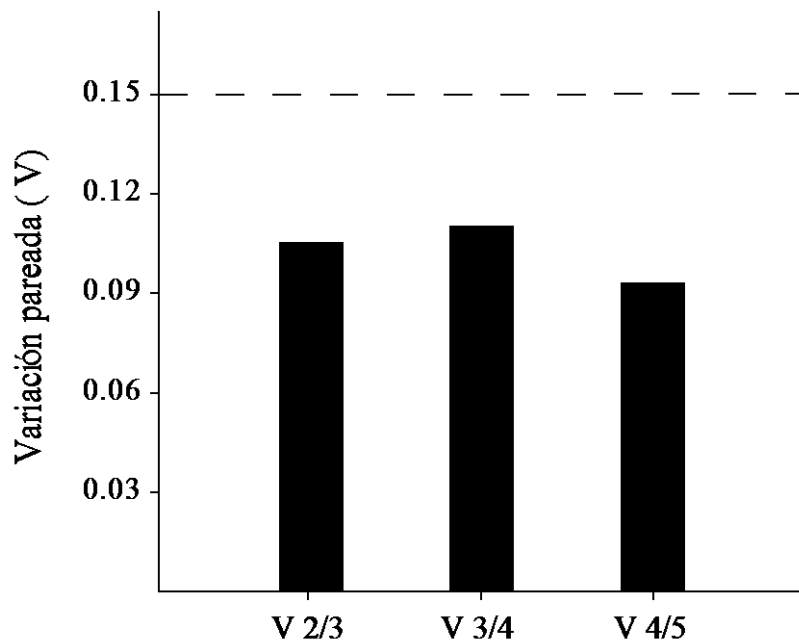
Con el fin de comparar los resultados de los algoritmos GeNorm y NormFinder, los datos también se analizaron utilizando el método BestKeeper que es independiente de clasificación. En la figura 13 b, se muestra el índice de estabilidad de BestKeeper, con este programa se encontró al igual que con GeNorm, los genes con mayor estabilidad fueron 28S ARNr (1.81) y *gapdh* (1.91), por lo tanto, adecuados para la normalización de los datos.

Con base al consenso de los tres programas utilizados, se decidió utilizar como genes de referencia 28S ARNr y *gapdh* para los análisis de expresión por qPCR en muestras provenientes de juveniles de talla pequeña.

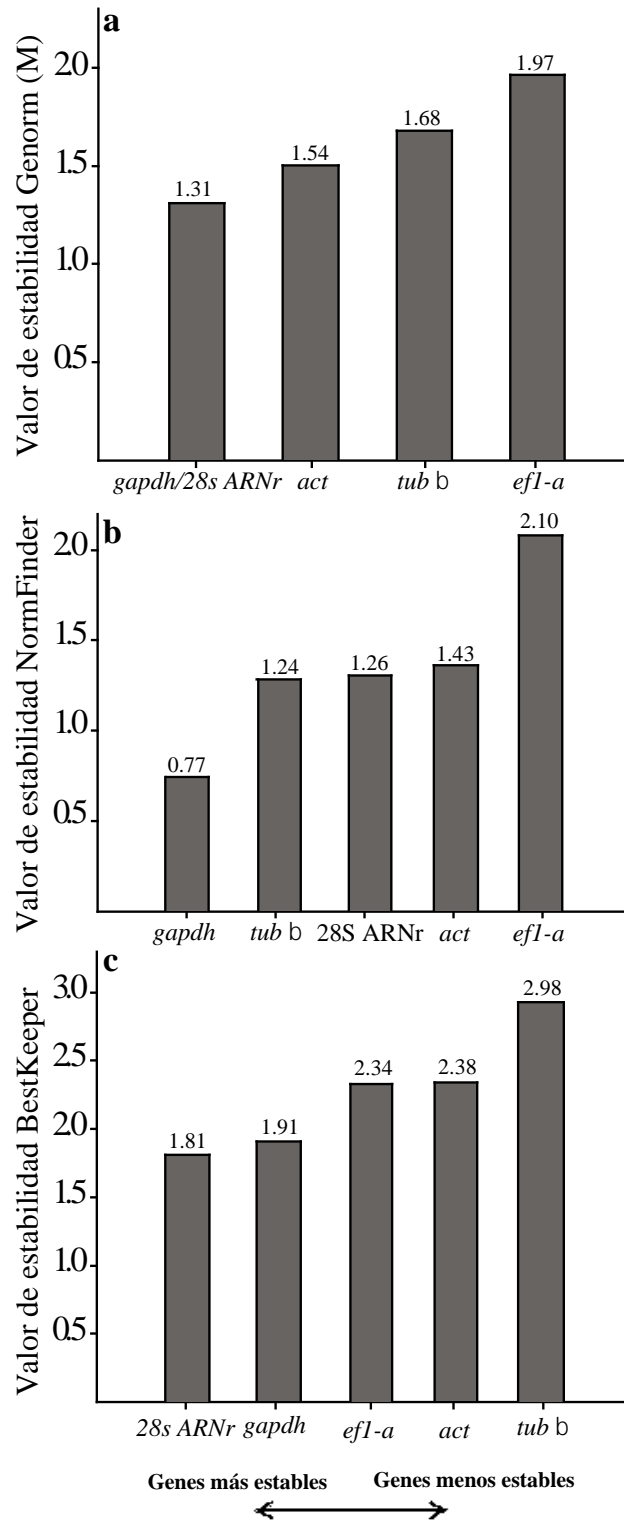


**Figura 11.** Promedio de la estabilidad de la expresión génica (M) de genes candidatos de referencia en *C. gigas* de  $3 \pm 1$  mm calculados con el software GeNorm. El valor de M bajo indica la media de los genes más estables (n = 18).





**Figura 12.** Determinación del número óptimo de genes de referencia para la normalización de análisis de la variación pareada (V) utilizando software GeNorm. Los valores indican la magnitud del cambio en el factor de normalización después de la inclusión de un gen de referencia adicional (n = 18).



**Figura 13.** Promedio de la estabilidad de la expresión génica de genes candidatos de referencia, en *C. gigas* de  $3 \pm 1$  mm calculados con GeNorm (a), BestKeeper (b) y NormFinder (c) (n = 18).

**7.8 Análisis cuantitativo de la expresión de genes de respuesta a estrés, defensa antioxidante, sistema inmune y detoxificación celular de juveniles de  $3 \pm 1$  mm de *C. gigas*.**

Se estudiaron las respuestas aguda (horas) y subcrónica (días) de *C. gigas* alimentado con células de *G. catenatum*, a través del análisis de los niveles de expresión de genes que codifican proteínas de estrés como glutamina sintetasa (GS), de defensa antioxidante como superóxido dismutasa tipo Cu/Zn (SOD-Cu/Zn), de detoxificación celular como glutatión S-transferasa (GST-S) y citocromo p450 isoforma CYP356A1 y de respuesta inmune como la Proteína de unión a LPS y  $\beta$ -1,3 glucano (LGBP) (fig. 14 y 15). En términos generales, las variaciones en los niveles de expresión de los genes analizados resultó ser dependiente del tiempo y de la concentración de células tóxicas. Los análisis de expresión se realizaron utilizando muestras de ADNc generadas a partir del ARN extraído del homogeneizado de cinco organismos completos (por triplicado). Los niveles de expresión de cada gen blanco, en las condiciones experimentales probadas (ostiones alimentados con mezclas *I. galbana*/*G. catenatum*) y de control positivo (ostiones alimentadas únicamente con *G. catenatum*), se compararon con la condición “control no tóxico o control negativo a toxina” (ostiones alimentadas con *I. galbana*) considerada “línea base”.

### 7.8.1 Bioensayo de exposición aguda con ostiones juveniles de $3 \pm 1$ mm de talla.

En todos los genes analizados, se produjeron cambios en el nivel de transcritos como respuesta de la exposición aguda a los dinoflagelados tóxicos (fig. 14).

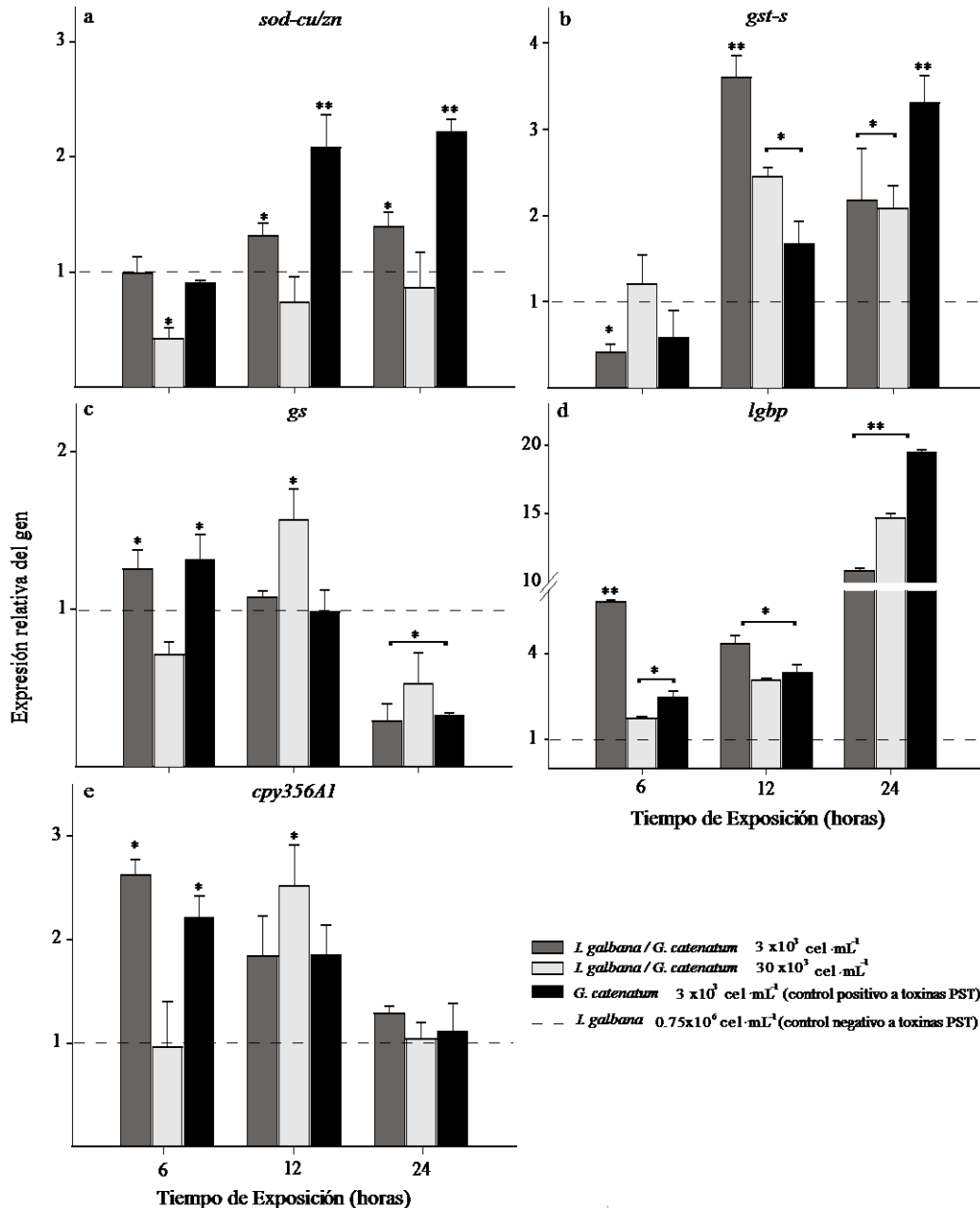
El nivel de transcritos del gen *sod-cu/zn* en los ostiones alimentados con la mezcla de  $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> de *G. catenatum*, aumentó 0.31 veces por encima de la línea base en las primeras 12 h de exposición, manteniéndose así durante 24 h. Por el contrario, la abundancia de transcritos de dicho gen en los ostiones alimentados con la mezcla de  $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> de *G. catenatum* disminuyó en las primeras horas (0.4 veces por debajo de la línea base), y alcanzó niveles de expresión igual que el control a las 24 h de exposición (fig. 14a). El nivel de transcritos en los ostiones alimentados sólo con *G. catenatum* ( $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ) después de 12 h de exposición 1.1 veces por encima de la línea base.

Los niveles de transcritos de *gst-s* disminuyeron en los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* ( $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) y en los alimentados con solo *G. catenatum* (control positivo) en las primeras 6 h. Un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) en el nivel de expresión, (fig. 14b) se observó en todos los tratamientos después de 12 h post-exposición. El mayor nivel del transcritos se observó a las 12 h en la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* ( $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) con 2.6 veces por arriba de la línea base y a las 24 h en los organismos alimentados con solo *G. catenatum* ( $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) con 2.3 veces por arriba de la línea base.

El gen *gs* mostró un aumento en los niveles de expresión durante las primeras 6 h de exposición en los organismos alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* ( $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) y aquellos alimentados solo con *G. catenatum* (Fig. 14c). Sin embargo, a las 12 h, el nivel de expresión de estos tratamientos regresó a nivel basal (organismos alimentados con el control *I. galbana*), mientras que el nivel de transcritos de dicho gen en los ostiones alimentados con la dieta mixta *I. galbana* + *G. catenatum* ( $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) incrementó 0.6 veces; una vez alcanzadas las 24 h de exposición, se observó una disminución en los niveles de expresión en todos los tratamientos ( $p < 0.05$ ) (Fig. 14c).

En el caso del gen *lgbp* el nivel de transcripción incrementó significativamente ( $p < 0.05$ ) a las 6 horas post-exposición en los organismos tratados; observando un incremento de 4.8 veces por encima de la línea base (fig. 14d), mientras que a las 12 h post-exposición, el nivel de transcritos se mantuvo entre 2.3-3.3 veces por encima de dicha línea. El mayor nivel de expresión se observó en todos los tratamientos a las 24 h post-exposición, cabe destacar que el mayor incremento 18.43 veces por arriba del nivel basal, se observó en los ostiones alimentados sólo con *G. catenatum* (control positivo o tóxico).

El efecto de *G. catenatum* a una concentración de  $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> en la transcripción de *cpy356A1*, así como en el control tóxico fue un incremento durante las primeras 6 h, alcanzando valores entre 1.6 y 1.2 por encima de la línea base (respectivamente), manteniendo dicho nivel hasta las 12 h. Sin embargo, el nivel de transcripción de organismos expuestos a la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* ( $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) aumentó 1.5 veces a las 12 h ( $p < 0.05$ ). En todos los tratamientos, los niveles de expresión volvieron a niveles basales después de 24 h de exposición (fig. 14e).



**Figura 14.** Análisis de la expresión relativa (qPCR) de los genes: **a)** superóxido dismutasa cobre/zinc (*sod-cu/zn*), **b)** glutatión S transferasa (*gst-s*), **c)** glutamina sintetasa (*gs*), **d)** proteína de unión a LPS y  $\beta$ -glucanos (*lgbp*), y **e)** del citocromo P450 isoforma *cpy356A1*. Los valores de expresión se muestran como expresión normalizada respecto a los genes de referencia *28s ARNr* y *gadph* y relativo al calibrador (línea punteada). Las barras representan la desviación estándar (SD), mientras los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos y el control negativo (\* $p < 0.05$ , \*\*  $p=0.001$ ; HSD de Fisher).

### 7.8.2 Bioensayo de exposición subcrónica con ostiones juveniles de $3 \pm 1$ mm de talla.

En este tipo de bioensayo se observó que el nivel de transcripción de los genes implicados en la línea de defensa antioxidante y detoxificación celular (*sod-cu/zn* y *gst-s*, respectivamente), en todos los tratamientos incrementó a los 7 días post-exposición disminuyendo a los 14 días (fig.15a). El nivel de transcritos de *sod-cu/zn* aumentó significativamente en todos los tratamientos ( $p < 0.05$ ): 10 veces por arriba de la línea base en los organismos alimentados la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* ( $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>), 71 veces en aquellos alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* ( $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) y 18 veces en los alimentados con el control tóxico (solo *G. catenatum*,  $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>); el nivel de expresión disminuyó a los 14 días post-exposición, sin embargo, en todos los casos se mantuvo por encima del valor del control.

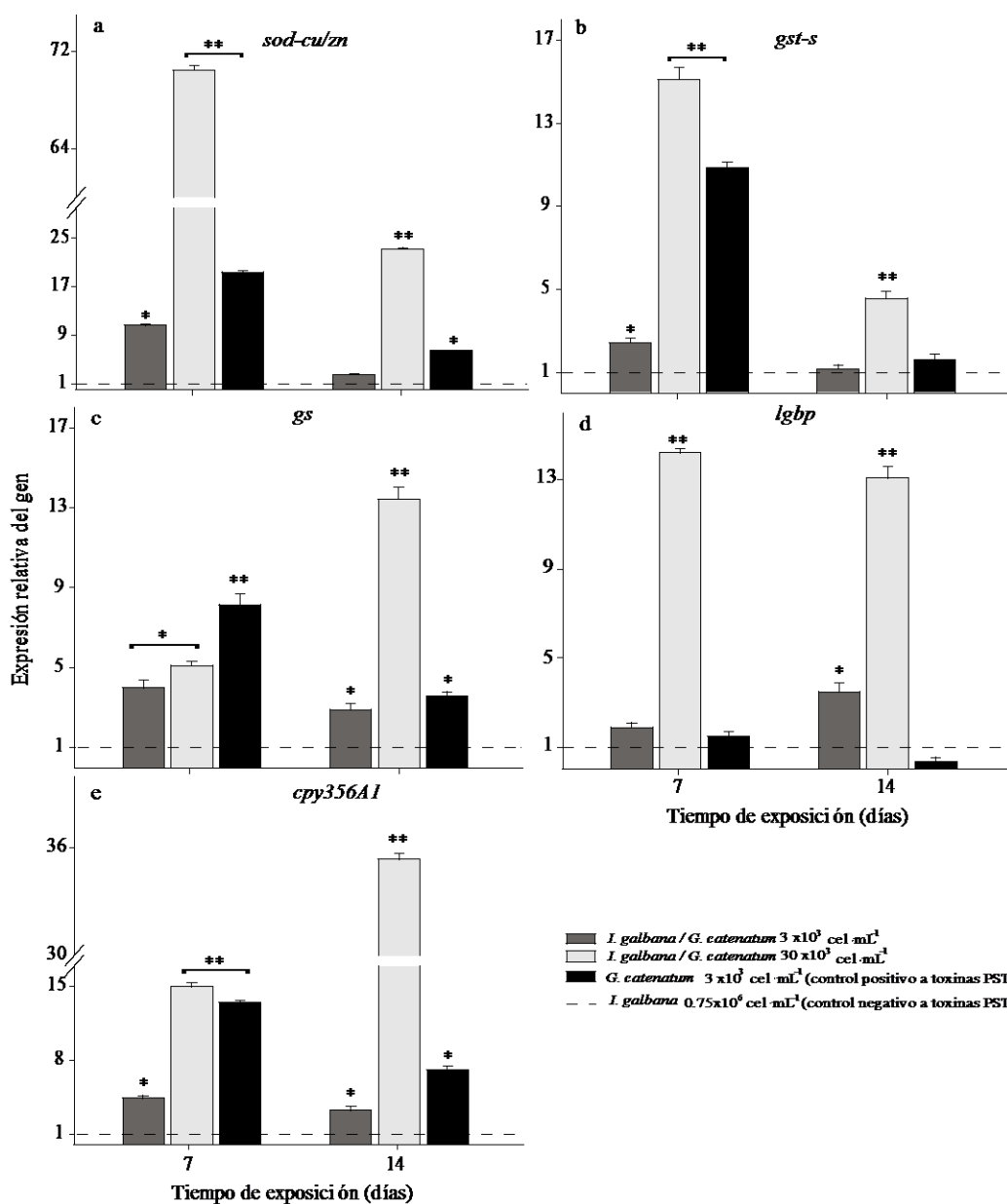
El efecto de *G. catenatum* a una concentración de  $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> en la transcripción de *gst-s* fue un incremento de 3 veces, 15 veces con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* ( $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) y 11 veces con el control tóxico. A los 14 días de exposición el nivel de expresión disminuyó al valor de la línea basal con la densidad más baja de *G. catenatum*, pero permaneció sobreexpresado (5 veces) con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum*  $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> (Fig. 15b). Así mismo, el nivel de transcritos de *gst-s* aumento significativamente ( $p < 0.05$ ) a los 7 días post-exposición en todos los tratamientos; 4 veces con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* de  $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>, 5 veces con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum*  $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> y 8 veces en el control tóxico (Fig. 15c). En cambio, dicho nivel disminuyó con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* 3

$\times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> y en el control tóxico, pero a los 14 días post-exposición aumentó 13 veces con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum*  $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>.

En el caso del gen *lgbp*, el efecto de la exposición al dinoflagelado tóxico, presentó un comportamiento muy particular (Fig. 15d). Las diferencias se relacionan con la cantidad de células tóxicas en el sistema del bioensayo; se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum*  $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> a los 7 y 14 días (12 veces por arriba de la línea de base). El nivel de expresión de este gen se mantuvo por encima del nivel basal (3 veces) en los organismos alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum*  $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>, y se reprimió en los organismos alimentados con el control tóxico al finalizar el periodo de exposición (día 14).

El gen *cpy356A1* mostró un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en los organismos alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum*  $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>, de 15 a 35 veces en los días 7 y 14 respectivamente, en comparación con los alimentados con *I. galbana* (fig. 15e). El nivel de expresión en los organismos alimentados solo con el control tóxico incrementó 14 veces por arriba de la línea basal en el día 7, disminuyendo el día 14 pero manteniéndose 6 veces por arriba de la línea basal. Los resultados indican que en *C. gigas* la transcripción de estos 5 genes se afecta por la presencia del dinoflagelado tóxico. La magnitud de este efecto depende del tiempo de exposición y de la concentración de células tóxicas, así como de la presencia de una segunda microalga en la dieta.





**Figura 15.** Análisis de la expresión relativa (qPCR) de los genes: a) superóxido dismutasa cobre/zinc (*sod-cu/zn*), b) glutatión S transferasa (*gst-s*), c) glutamina sintetasa (*gs*), d) proteína de unión a LPS y  $\beta$ -glucanos (*lgbp*), y e) del citocromo P450 isoforma *cpy356A1*. Los valores de expresión se muestran como expresión normalizada con los genes de referencia *28s ARNr* y *gapdh* y relativo al calibrador (línea punteada). Las barras representan la desviación estándar (SD), mientras que los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos y el control negativo (\*  $p < 0.05$ , \*\* $p = 0.001$ ; HSD de Fisher).

## **7.9 Análisis cuantitativo de la expresión de genes involucrados en la regulación del ciclo celular, citoesqueleto, inflamación, apoptosis, cadena respiratoria y regulación proteica de juveniles de $3 \pm 1$ mm de *C. gigas*.**

Por otra parte, se analizó el efecto de la exposición (aguda y subcrónica) de *C. gigas* a *G. catenatum* en los niveles de expresión de genes involucrados en: a) la regulación del ciclo celular: Factor 1 de ensamblaje de cromatina subunidad p55 (*p55*), Proteína p21 (*p21*), Factor de elongación 2 (*ef2*) y proteína supresora de tumores (*p53*); b) la estabilidad del citoesqueleto: actina (*act*), tubulina  $\beta$  (*tub  $\beta$* ); c) en procesos inflamatorios: caspasa 1 (*caspl*); d) cadena respiratoria: citocromo C oxidasa (*coi*) y e) de regulación proteica: tripsina (*tryp*) (fig. 16). Las muestras derivadas del bioensayo agudo fueron inicialmente analizados mediante de RT-PCR semicuantitativo, los resultados obtenidos se muestran en el anexo III.

En el presente trabajo, nos enfocamos a analizar y describir a detalle los cambios en el nivel de expresión durante el período de exposición sub-crónica (14 días) a través de análisis cuantitativos por qPCR.

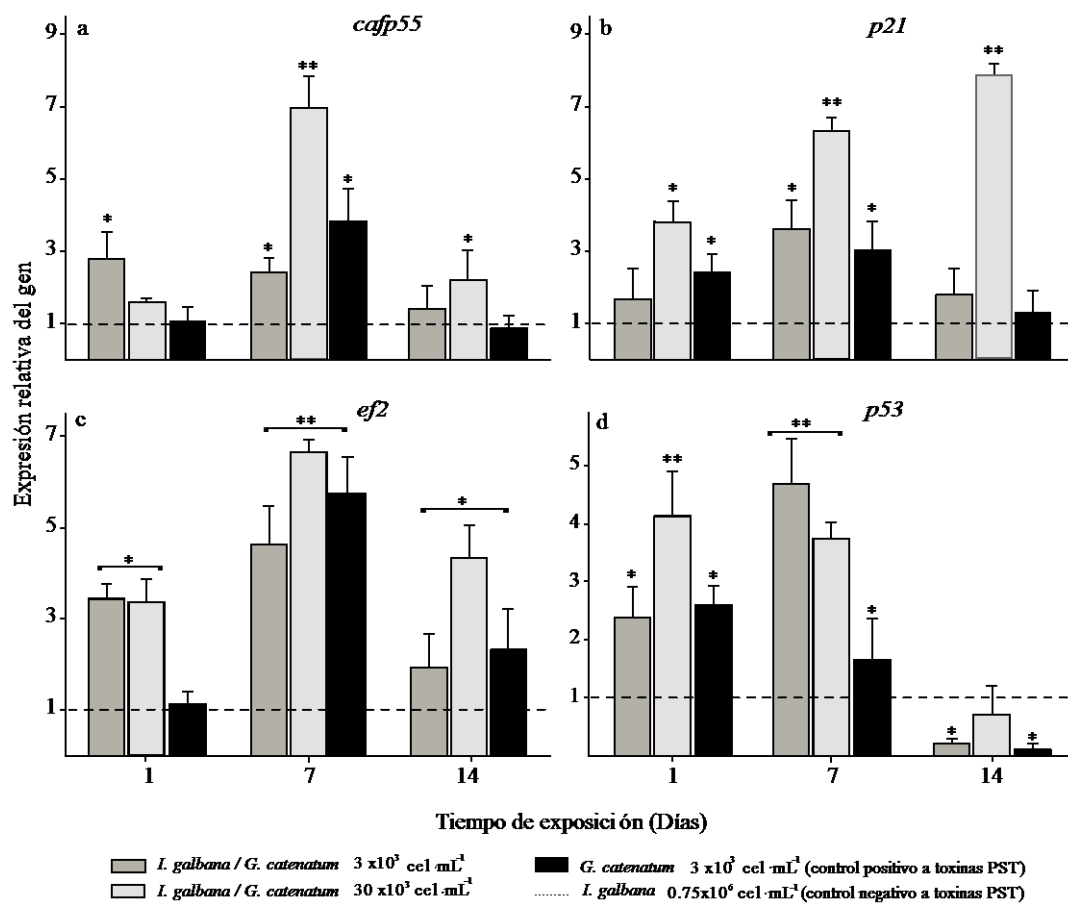
### **7.9.1 Genes del ciclo celular**

En el caso de los genes involucrados en la regulación del ciclo celular, se puede observar que el nivel de transcripción el gen que codifica *p55* aumenta significativamente ( $p < 0.05$ ) en los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* (3

$\times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) después del primer día de exposición (fig. 16a). Por otro lado, en una exposición sub-crónica los valores de transcripción más altos se presentaron en el día 7 en los ostiones alimentados solo con el control tóxico con 3 veces por arriba de la línea basal, y en la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum*  $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> con 1.5 veces. En cambio, el nivel de transcripción aumentó significativamente en los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* ( $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) con 5 veces por arriba de la línea base para el día 14; en los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* ( $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) el nivel de expresión disminuyó hasta casi alcanzar el nivel basal 0.5 veces por arriba de dicho nivel y, por último, el nivel de transcripción en los ostiones alimentados solo con *G. catenatum* no vario en relación con la línea basal (fig. 16b).

En general, los transcritos del gen que codifica la proteína *p21* se incrementó en todos los tratamientos, de manera significativa ( $p < 0.05$ ) en las muestras de ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* ( $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) con 4 veces por arriba de la línea basal. En la exposición sub-crónica se encontró que la expresión de este gen aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ) alcanzando niveles más altos al día 7, principalmente en los organismos alimentados con el control tóxico con 5 veces arriba del nivel basal, y en la dieta mixta con  $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> del dinoflagelado con 4.5 veces. El nivel de expresión para dicho gen disminuyó hasta el nivel basal en los organismos alimentados con el control tóxico al día 14; en los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* ( $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>), y con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* ( $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) el nivel de transcritos incrementó significativamente ( $p < 0.05$ ) 16 veces por arriba del nivel basal (Fig. 16b).

En el caso del gen *ef2*, el nivel de transcritos aumentó en los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* ( $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) y con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* ( $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) alrededor de 3 veces durante el primer día de exposición ( $p < 0.05$ ). El incremento en la transcripción de dicho gen fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) en los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* ( $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) con 12 veces arriba del nivel basal, en los organismos alimentados con el control tóxico (solo *G. catenatum*) con 5 veces y en los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* ( $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) con 4 veces por arriba del nivel basal al día 7 de exposición (Fig. 16 c). El nivel de transcrito disminuyó tanto en los ostiones alimentados con las 2 dietas mixtas como con el control tóxico o positivo, sin embargo siguieron permaneciendo por arriba del nivel basal (es decir sobreexpresados); la dieta mixta de *I. galbana* + *G. ctatenatum* ( $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) fue el tratamiento que continuó con una mayor sobreexpresión 4 veces por arriba del nivel basal al final del experimento día 14 de exposición. Para el gen *p53*, se observó sobreexpresión en los ostiones alimentados con ambas dietas mixtas así como en el control tóxico a partir del día 3. La mayor sobreexpresión se encontró en el día 7 principalmente en los ostiones alimentados con las dietas mixtas (Fig. 16d). Sin embargo, se observó represión de este gen en los ostiones alimentados tanto con las dietas mixtas como con el control tóxico en el día 14.



**Figura 16.** Análisis de la expresión relativa (qPCR) de los genes de *C. gigas* bajo exposición subcrónica a *G. catenatum*. Paneles: a) Factor 1 de ensamblaje de cromatina subunidad p55 (*p55*), b) Proteína p21 reguladora del ciclo celular (*p21*), c) Factor de elongación 2 (*ef2*), d) Proteína p53 (*p53*). Los valores de expresión se muestran como expresión normalizada con los genes de referencia 28S ARNr y *gapdh* y relativo al calibrador (línea punteada). Las barras representan la desviación estándar (SD) y los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos y el control negativo (\* $p < 0.05$ , \*\* $p = 0.001$ ; HSD de Fisher).

### 7.9.2 Genes del citoesqueleto y procesos inflamatorios

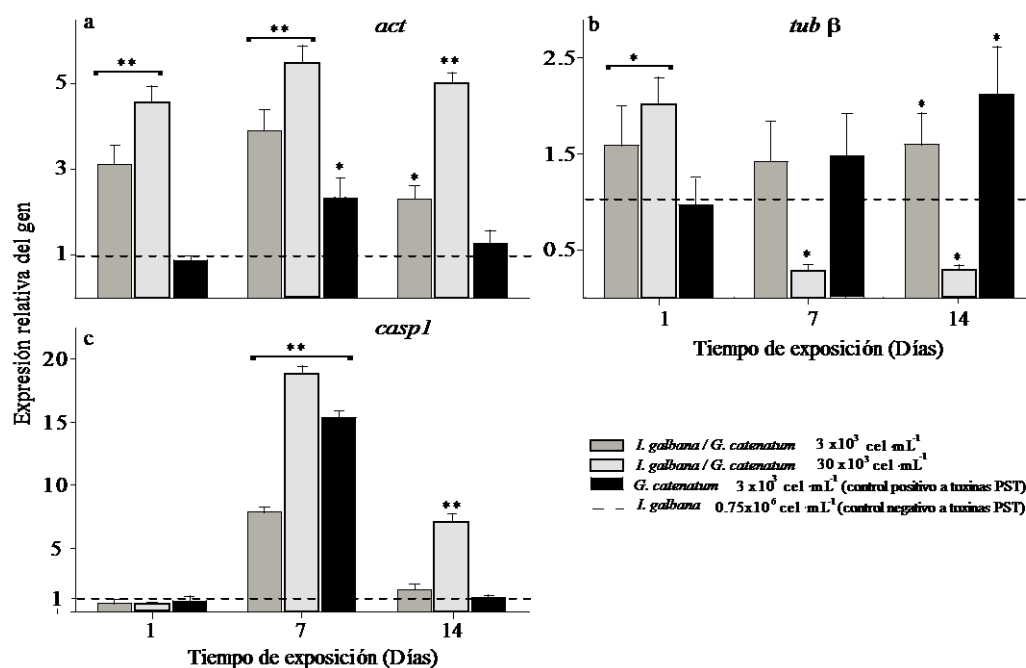
La transcripción de *act* se incrementó significativamente ( $p < 0.05$ ) en organismos alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* ( $3 \times 10^3$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ) y en organismos alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* ( $30 \times 10^3$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ) con 3 y 4.5 veces arriba del nivel basal respectivamente en el primer día de exposición.

En un periodo de mayor de exposición (7 días) la transcripción de *act* se incrementó a 3.5 y 5 veces respectivamente en los ostiones alimentados con  $3 \times 10^3$  y  $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> de *G. catenatum*, este último permanece así hasta el final del experimento (día 14); en los ostiones alimentados con el control tóxico (sólo con *G. catenatum*) incrementó 3 veces a los 7 d y disminuyó hasta alcanzar el nivel basal a los 14 d (fig. 17a).

Así mismo, el nivel de transcritos de *tub β* se incrementó en los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* ( $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) y los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* ( $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) 1.5 y 2 veces respectivamente. No obstante, ante un periodo más prolongado de exposición la transcripción se reprime considerablemente en los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* ( $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) lo que implica hasta 0.7 veces por abajo del nivel basal, manteniéndose así hasta el día 14. En los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* ( $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>), el nivel de transcrito de *tub β* se mantuvo sobreexpresado después de 7 días de exposición, pero aumentó su transcripción significativamente ( $p < 0.05$ ) al día 14 de exposición, al igual que en los ostiones alimentados sólo con *G. catenatum* 2 veces por arriba del nivel basal (fig. 17 b).

En relación a la transcripción de *casp 1*, esta se mantuvo en niveles basales durante el primer día de exposición al dinoflagelado, sin embargo, tras 7 días de exposición se observó un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) en los ostiones alimentados con los dos tratamientos y el control tóxico, siendo mayor con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* ( $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) con 18 veces por arriba del nivel basal y en los organismos alimentados con el control tóxico con 14 veces. El nivel de transcritos disminuyó hasta

igualar el nivel basal en los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* ( $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) y en los alimentados con el control tóxico (sólo *G. catenatum*), mientras que en los organismos alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* ( $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) el gen permaneció sobreexpresado 7 veces por encima del nivel basal (fig. 17c).

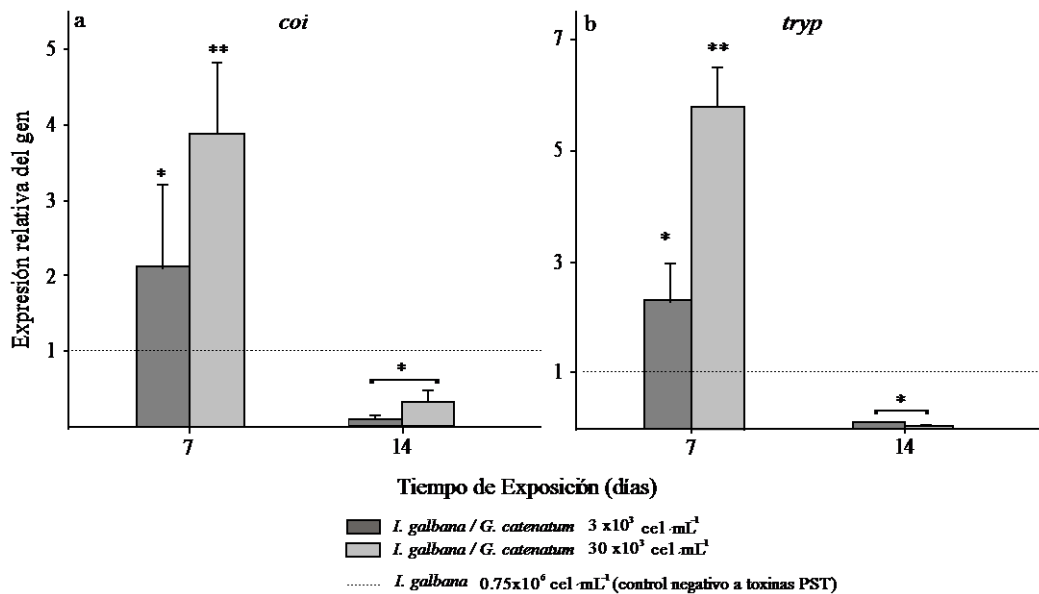


**Figura 17.** Análisis de la expresión relativa (qPCR) de los genes de *C. gigas* relacionados con el citoesqueleto y sistema inmune, bajo exposición a *G. catenatum*. Paneles: **a)** Actina (*act*); **b)** Tubulina β (*tub β*), **c)** Caspasa 1 (*casp1*). Los valores de expresión se muestran como expresión normalizada con los genes de referencia 28S ARNr y *gapdh* y relativo al calibrador (línea punteada). Las barras representan la desviación estándar (SD) y los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos y el control negativo (\* p < 0.05, \*\* p = 0.001; HSD de Fisher).

### 7.9.3 Gen de la citocromo oxidasa I (*coi*) y de tripsina (*tryp*)

Por otro lado, también se monitoreo la expresión de gen *coi*, encontrándose que a los 7 d de exposición el nivel de transcritos se incrementó (p < 0.05) significativamente con  $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> (2 veces) y  $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> (3 veces) de *G. catenatum* por encima de la

línea basal. En cambio, la transcripción se reprimió significativamente (valores por debajo de la línea basal) después de 14 días de exposición al dinoflagelado (fig. 18 a). Finalmente, el gen *tryp*, mostró un comportamiento similar al del *coi*, con una sobreexpresión con ambos tratamientos a los 7 d de exposición, siendo mayor con  $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> (7 veces) (fig. 18 b).



**Figura 18.** Análisis de la expresión relativa (qPCR) de los genes de *C. gigas* bajo exposición a *G. catenatum*. Paneles: **a**) citocromo oxidasa I (*coi*), **b**) tripsina (*tryp*). Los valores de expresión se muestran como expresión normalizada con los genes de referencia *28s ARNr* y *gapdh* y relativo al calibrador (línea de puntos). Las barras representan la desviación estándar (SD), los asterisco indican diferencias significativas entre los tratamientos y el control negativo (\* $p < 0.05$ , \*\* $p = 0.001$ ; HSD de Fisher).



### **7.10 Determinación de la estabilidad de los genes de referencia candidatos en glándula digestiva y hemocitos en juveniles de $50 \pm 10$ mm de *C. gigas*.**

Se determinó la estabilidad de la expresión de cinco genes de referencia (*tub  $\beta$* , *efl- $\alpha$* , *act*, *gapdh* y *28s ARNr*) como se menciona en el apartado 6.10, midiendo sus niveles de expresión en muestras de ADNc de glándula digestiva de ostiones alimentados con una dieta mixta de *I. galbana* ( $2 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>) + *G. catenatum* ( $6 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>), comparando con un control no tóxico de *I. galbana* ( $2 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>) y un control tóxico dieta con solo *G. catenatum* ( $6 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>). Para cada muestra, se calculó la estabilidad de la expresión de cada gen utilizando la media geométrica de los valores Ct. Los análisis se realizaron directamente en la página web: RefFinder (<http://www.leonxie.com/referencegene.php?type=reference#>) utilizando los programas GeNorm, NormFinder y BestKeeper.

#### 7.10.1 Análisis Genorm

Con el programa GeNorm, se estimó la estabilidad de la expresión (M) de cada gen de referencia candidato evaluado (fig. 19a). Un valor de M bajo indica una expresión muy estable, en las condiciones de ensayo, del gen analizado. Los genes con los valores de M más bajos fueron: *gapdh* y *efl- $\alpha$*  con un valor de 1.10. Los valores de M por arriba de 1.5 indican una alta variabilidad bajo las condiciones probadas, por lo tanto, no podrían utilizarse como genes de referencia.

### 7.10.2 Análisis de BestKeeper

En la figura 19b, se muestra el índice de estabilidad obtenido con BestKeeper, que al igual que GeNorm, permitió identificar como los genes con mayor estabilidad a *gapdh* (1.38) y *ef1- $\alpha$*  (1.70), por lo que pueden considerarse adecuados para la normalización de los datos.

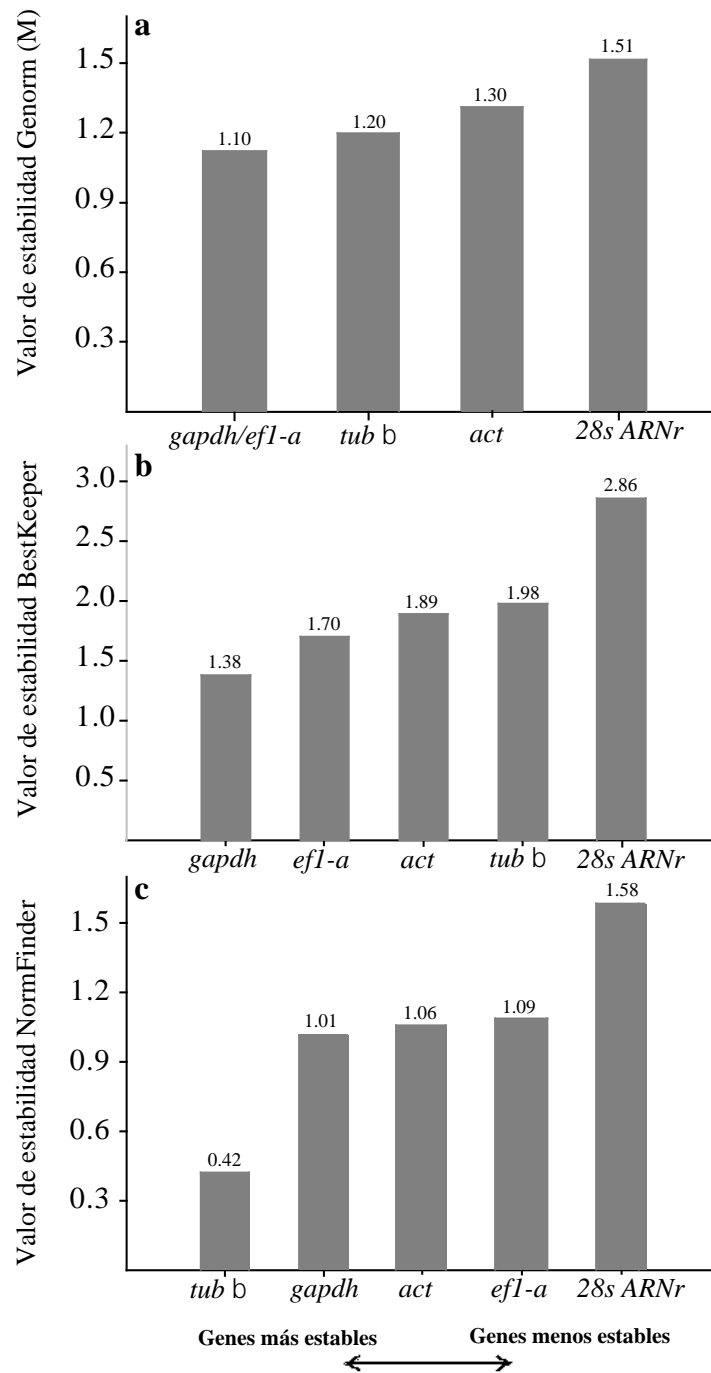
### 7.10.3 Análisis NormFinder

Los resultados encontrados con este programa mostraron que el gen con mayor estabilidad bajo las condiciones de ensayo es *tub  $\beta$*  (0.42) ya que presento un valor cercano a cero.

Con base al consenso de los resultados de los tres programas utilizados, se decidió utilizar *gapdh*, *ef1- $\alpha$*  y *tub  $\beta$*  como genes de referencia para realizar los análisis de expresión por qPCR en glándula digestiva de *C. gigas* (fig. 19c).

Así mismo, se analizó la estabilidad de la expresión de cinco genes de referencia (*tub  $\beta$* , *ef1- $\alpha$* , *act*, *gapdh* y *28s ARNr*) como se menciona en el apartado 6.10, midiendo sus niveles de expresión en muestras de ADNc de hemocitos de ostiones alimentados con una dieta mixta de *I. galbana* ( $2 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>) + *G. catenatum* ( $6 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>), comparando con un control no tóxico de *I. galbana* ( $2 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>) y un control tóxico dieta con solo *G. catenatum* ( $6 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>). Para cada muestra, se calculó la estabilidad de la expresión de cada gen utilizando la media geométrica de los valores Ct. Cabe aclarar que los valores de ct para *act* y *tub  $\beta$*  mostraron inconsistencias por lo que se descartaron para este análisis. El

análisis se realizó directamente en la página web: RefFinder (<http://www.leonxie.com/referencegene.php?type=reference#>) utilizando los programas GeNorm, NormFinder y BestKeeper. En la tabla VIII, se muestran los valores de estabilidad para los 3 genes analizados con cada programa utilizado. Genorm y NormFinder coincidieron en que *28s ARNr* y *gapdh* fueron los 2 genes más estables y BestKeeper mostró al gen *ef1- $\alpha$*  como el más estable, entonces, se tomó la decisión de incluir los 3 genes como endógenos para realizar los análisis de expresión en hemocitos de *C. gigas*.



**Figura 19.** Promedio de la estabilidad de la expresión de genes candidatos de referencia en glándula digestiva de juveniles de  $50 \pm 10$  mm de *C. gigas*, calculados con los softwares GeNorm (a), BestKeeper (b) y NormFinder (c) ( $n = 18$ ).

**Tabla VIII.** Análisis de estabilidad de los genes de referencia en hemocitos de juveniles de  $50 \pm 10$  mm de *C. gigas*.

<b>Gen</b>	<b>Valor de estabilidad</b>		
	<b><u>GeNorm (M)</u></b>	<b><u>NormFinder</u></b>	<b><u>BestKeeper</u></b>
<i>28s ARNr</i>	1.40	1.11	2.04
<i>Gapdh</i>	1.40	1.63	1.96
<i>ef1-<math>\alpha</math></i>	2.23	1.84	1.57

**7.11 Análisis cuantitativo de genes de regulación del ciclo celular, citoesqueleto, inflamación, apoptosis y detoxificación en glándula digestiva de juveniles de  $50 \pm 10$  mm de *C. gigas*.**

7.11.1 Genes de regulación del ciclo celular

Para determinar el efecto de la exposición de *C. gigas* al dinoflagelado tóxico a nivel de glándula digestiva, se determinaron los cambios a nivel de transcripción de genes que participan en puntos clave de control y reparación del daño dentro de la progresión del ciclo celular, genes relacionados con procesos de inflamación, apoptosis y citoesqueleto, para de esta forma analizar y entender la posible correlación sobre un efecto genotóxico de las PST producidas por *G. catenatum*.

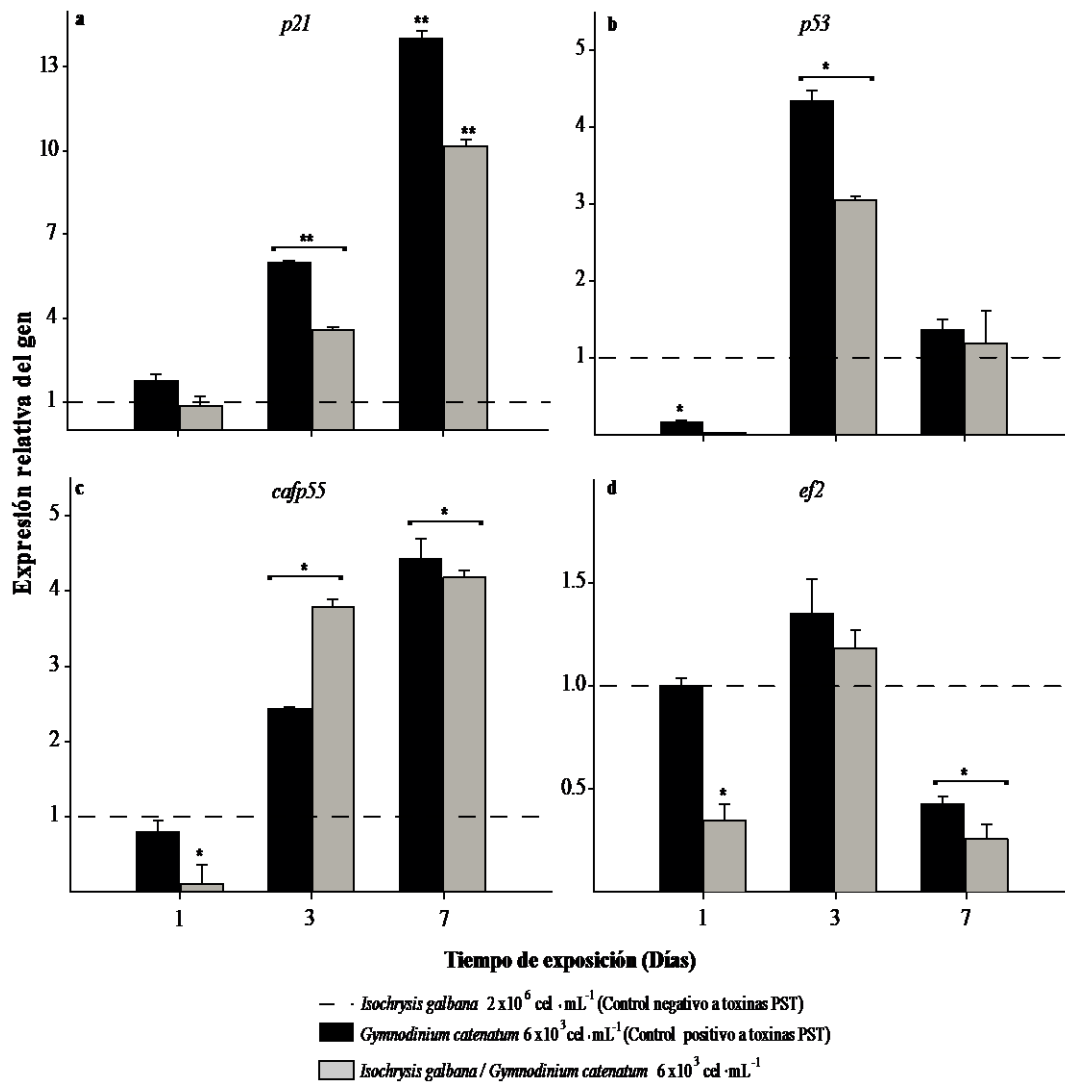
En este estudio, la exposición modificó la cantidad de transcritos en los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* ( $2 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>) + *G. catenatum* ( $6 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>), y el control tóxico (sólo *G. catenatum*). Como puede observarse en la figura 20, en

todos los genes analizados los cambios a nivel de síntesis de mensajeros se presentan a partir del día 3 de exposición. Para el gen *p21*, el mayor nivel de transcripción se encontró en el control toxico ( $6 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> de *G. catenatum*), donde el máximo se registró al día 7 con 13 veces arriba del nivel basal (fig. 20a).

Por otro lado, el gen *p53* se observó completamente reprimido en los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* ( $2 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>) + *G. catenatum* ( $6 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>), así como en el control tóxico ( $6 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> de *G. catenatum*) a las 24 h de exposición; sin embargo, se encontraron niveles máximos de 4 veces por arriba del nivel basal en ambos tratamientos a los 3 días de exposición (fig. 20b).

El nivel de transcritos de *cafp55*, se incrementó significativamente en los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* ( $2 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>) + *G. catenatum* ( $6 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) a partir de los 3 días de exposición con 4 veces arriba del nivel basal y en los ostiones alimentados con el control tóxico con 3 veces (fig. 20c).

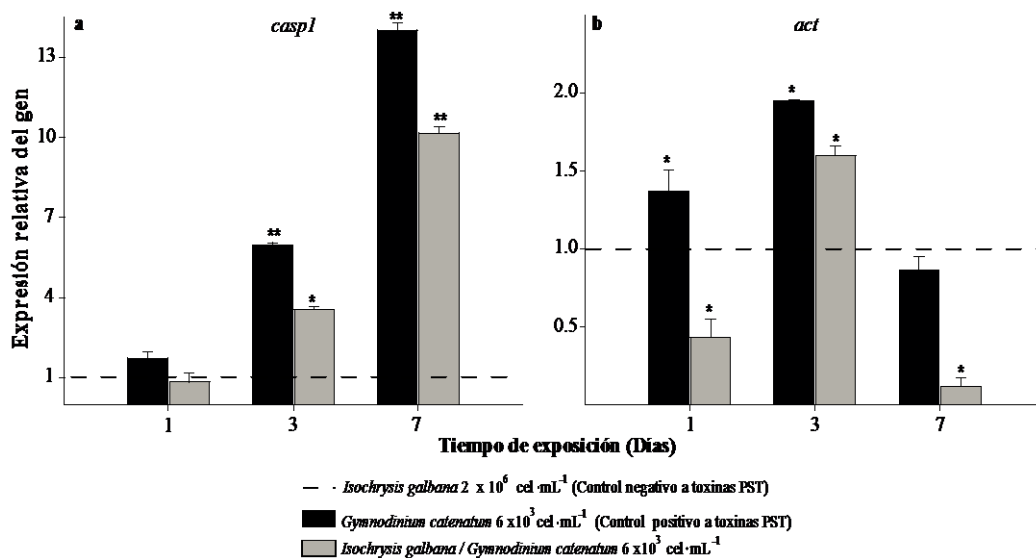
La expresión de *ef2* solo presentó un ligero aumento con la dieta mixta y en el control tóxico a los 3 días de exposición, sin embargo, a los 7 días se reprimió 0.5 veces por debajo del nivel basal en ambas condiciones (fig. 20d).



**Figura 20.** Análisis de la expresión relativa (qPCR) de los genes de *C. gigas* relacionados con la regulación del ciclo celular en glándula digestiva, bajo exposición subcrónica a *G. catenatum*. Paneles: a) Proteína p21 reguladora del ciclo celular (*p21*); b) Proteína p53 (*p53*); c) Factor 1 de ensamblaje de cromatina subunidad p55 (*cafp55*); d) Factor de elongación 2 (*ef2*). Los valores de expresión se muestran como expresión normalizada con genes de referencia *gapdh*, *ef1-α* y *tub β* y relativo al calibrador (línea de puntos). Las barras representan la desviación estándar (SD) mientras que el asterisco indica diferencias significativas entre los tratamientos y el control negativo (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ ; HSD de Fisher).

## 7.11.2 Genes involucrados en procesos inflamatorios y el citoesqueleto

El nivel de transcritos del gen de la *casp1*, no sufrió modificaciones durante las primeras 24 h de exposición al dinoflagelado, sin embargo, se observó una sobreexpresión significativa después de los 3 días, permaneció así hasta los 7, tanto con la dieta mixta ( $6 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> de *G. catenatum*) y el control tóxico. En este último, se registraron los valores máximos de hasta 13 veces por arriba del nivel basal a los 7 días (fig. 21a). En el control tóxico, el nivel de transcritos del gen de la *act* se sobreexpresó durante los 3 primeros días de exposición y se reprimió hasta alcanzar el nivel basal a los 7 días, mientras que el tratamiento con  $6 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> presentó un ligero incremento a los 3 días de exposición, pero se observó casi completamente reprimido a los 7 días (fig. 21b).



**Figura 21.** Análisis de la expresión relativa (qPCR) de los genes de *C. gigas* relacionados con la regulación del ciclo celular y citoesqueleto en glándula digestiva, bajo exposición subcrónica a *G. catenatum*. Paneles: **a)** Actina (*act*), **b)** Caspasa 1 (*casp1*). Los valores de expresión se muestran como expresión normalizada con los genes de referencia *gapdh*, *ef1- $\alpha$*  y *tub  $\beta$*  (genes de referencia) y relativo al calibrador (línea de puntos). Las barras representan la desviación estándar (SD) y los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos y el control negativo (\* $p < 0.05$ , \*\* $p = 0.001$ ; HSD de Fisher).



### 7.12 Análisis cuantitativo de genes relacionados con la respuesta inmune en hemocitos de juveniles de $50 \pm 10$ mm de *C. gigas*.

En este trabajo, se encontró que en los hemocitos de ostiones expuestos a *G. catenatum*, los cuatro genes relacionados al sistema inmune (*lgbp*, *if44*, *cvt* y *hsp70*) fueron regulados, observándose que la mayor sobreexpresión se presentó en los ostiones alimentados con el control tóxico ( $6 \times 10^3$  cel  $\text{mL}^{-1}$  de *G. catenatum*) en el primer día de exposición.

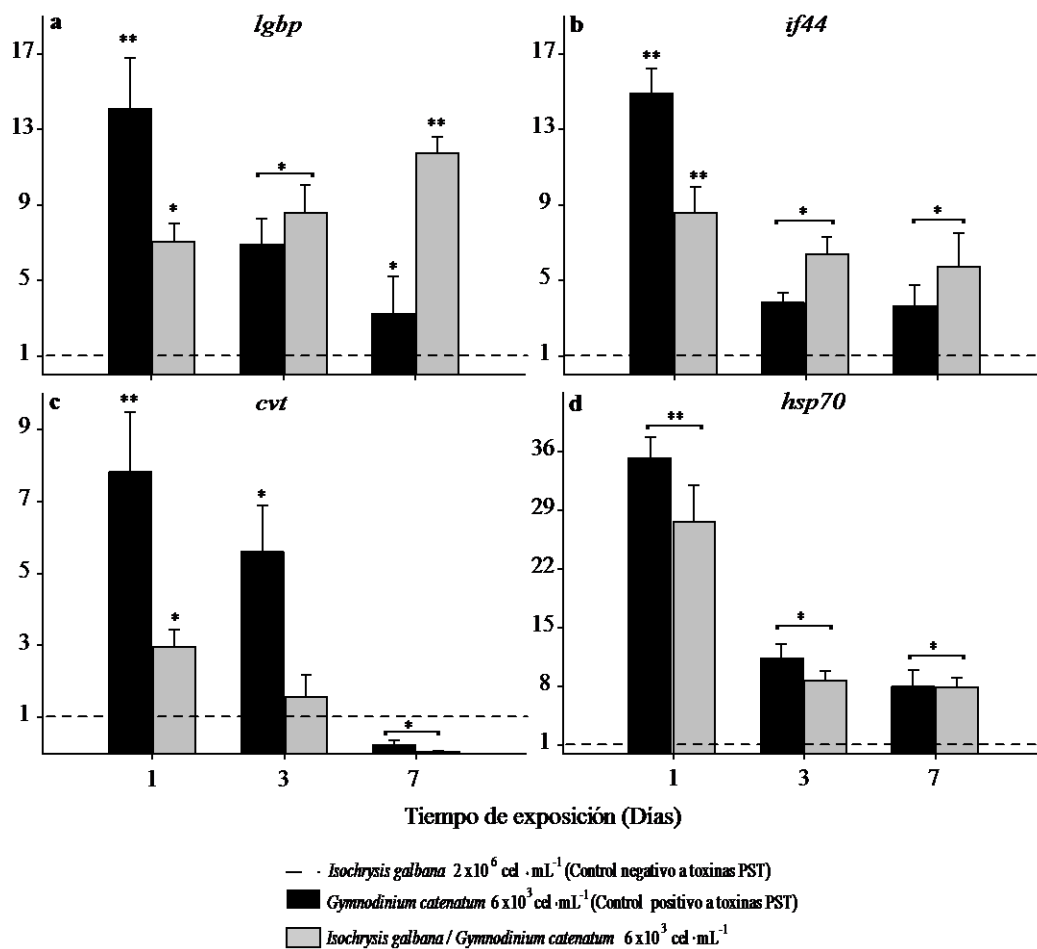
El nivel de expresión del gen *lgbp* se incrementó en los ostiones alimentados con el control tóxico, 12 veces por encima del nivel basal en el primer día de exposición, disminuyendo a los 3 días, sin embargo, aún se mantuvo sobreexpresado quedando arriba del nivel basal. En los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* ( $2 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ) + *G. catenatum* ( $6 \times 10^3$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ) la transcripción de *lgbp* se incrementó desde el día uno 1 hasta el día 7, alcanzando un valor máximo de 9 veces por arriba del nivel basal (fig. 22a).

El gen *if44* se sobreexpresó en los ostiones alimentados tanto con la dieta mixta como con el control tóxico, mostrando valores de 8 y 13 veces respectivamente por arriba del nivel basal para el día uno, posteriormente disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) en ambas condiciones a los 3 d de exposición (fig. 22b).

El gen *cvt* se sobreexpresó en los primeros 3 días de exposición al dinoflagelado, con un valor máximo en los ostiones alimentados con el control tóxico con 7 veces arriba del nivel

basal para el día 1, sin embargo, después del día 3 se reprimió significativamente ( $p < 0.05$ ) por abajo del nivel basal después de 7 días de exposición en dicho tratamiento. En los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* ( $2 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>) + *G. catenatum* ( $6 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>), sigue un comportamiento igual, con una mayor sobreexpresión para el día 1 con 3 veces por arriba del nivel basal y con una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) hasta casi reprimirse en el día 7 de exposición (fig. 22c).

El nivel de transcritos del gen *hsp70* incrementó significativamente ( $p < 0.05$ ) durante el primer día de exposición, con valores de 35 veces por arriba del nivel basal en los ostiones alimentados con el control tóxico y 28 veces en la dieta mixta de *I. galbana* ( $2 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>) + *G. catenatum* ( $6 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>); después del día 3 se observó una disminución en el nivel de transcripción en ambas condiciones, pero aún se mantiene sobreexpresado por arriba del nivel basal con valores de 8 veces hasta concluir el experimento (al día 7) (fig. 22d).



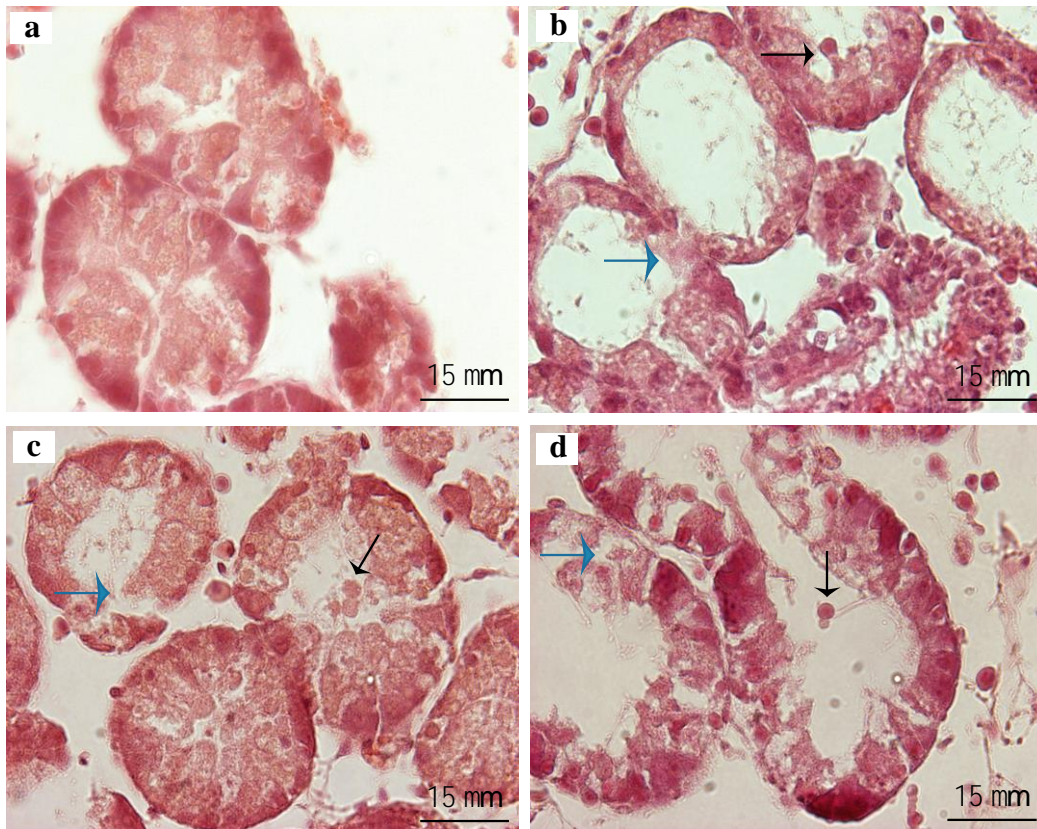
**Figura 22.** Análisis de la expresión relativa (qPCR) de los genes de *C. gigas* de genes relacionados con la respuesta inmune en hemocitos de *C. gigas*, bajo exposición subcrónica a *G. catenatum*. Paneles: **a**) Proteína de unión a LPS y  $\beta$ -1,3glucano (*lgbp*); **b**) Proteína inducida por interferón 44 (*if44*); **c**) Cavortina (*cvt*); **d**) Proteína de shock térmico HSP70 (*hsp70*). Los valores de expresión se muestran como expresión normalizada con los genes de referencia *gapdh*, *28s ARNr* y *ef1- $\alpha$*  y relativo al calibrador (línea de puntos). Las barras representan la desviación estándar (SD) mientras que los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos y el control negativo (\* $p < 0.05$ , \*\* $p = 0.001$ ; HSD de Fisher).

### 7.13 Análisis histológico en juveniles de *C. gigas* de $3 \pm 1$ mm

#### 7.13.1 Glándula digestiva

Las lesiones y los cambios estructurales que se observaron en la glándula digestiva de *C. gigas* de  $3 \pm 1$  mm de talla alimentados con las dietas mixtas y el control tóxico durante los 14 días de exposición fueron aplanamiento celular, inflamación, ruptura, exfoliación, y metaplasia. Los ostiones alimentados con el control no tóxico (*I. galbana*) mostraron en las células de absorción de los túbulos de la glándula digestiva una altura normal, los epitelios no se observaron aplanados y el lumen de los túbulos de la glándula presento una forma normal estrellada (Fig. 23a). En cambio en los ostiones alimentados con la dieta mixta de  $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> de *G. catenatum*, en las células de absorción del epitelio de forma cuboidal se observó una altura intermedia y desprendimiento de algunas células dentro del lumen de los túbulos (Fig. 23c). Los ostiones alimentados con el control tóxico (Fig. 23b) y la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* ( $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) presentaron una disminución considerable en la altura de las células de absorción de los túbulos de la glándula digestiva, con una exfoliación aguda del epitelio digestivo principalmente en la dieta mixta y migración de las células de absorción al lumen de la glándula (Fig. 23d), como es indicado en la figura con flechas negras. Además, en los organismos alimentados con el control tóxico se puede observar metaplasia del epitelio de la glándula digestiva que muestra una apariencia cuboidal baja de las células epiteliales acompañada por una marcada dilatación de la luz de la glándula digestiva y ruptura del epitelio (como se indican en la figura con flechas en color azul). Sin embargo, los ostiones alimentados con la dieta

mixta con  $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> de *G. catenatum* fueron los más severamente afectados, presentando apariencia escamosa del epitelio tubular y metaplasia (flechas en color azul).

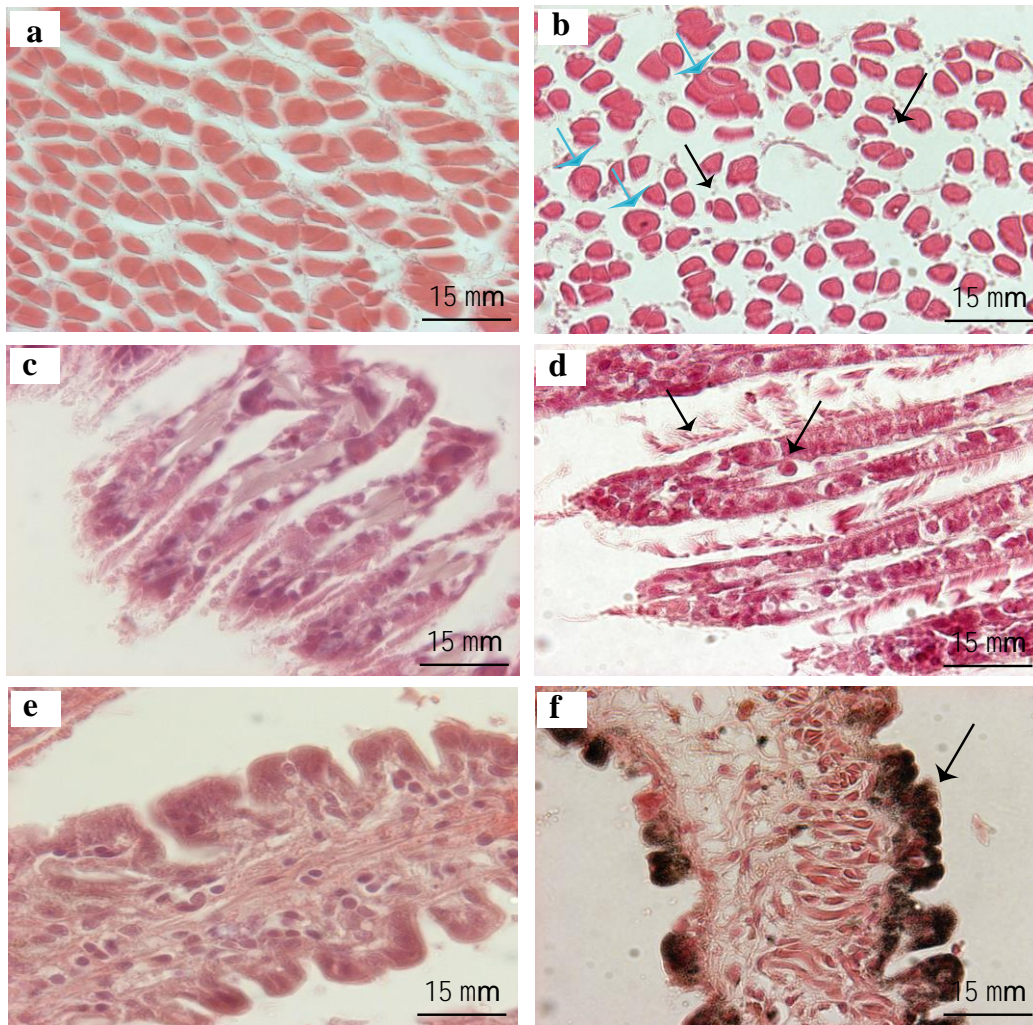


**Figura 23.** Corte transversal de los túbulos de la glándula digestiva de juveniles de *C. gigas* de  $3 \pm 1$  mm, expuesto a *G. catenatum* (técnica de tinción, hematoxilina-eosina). Paneles: **a)** organismo control alimentados con *I. galbana* ( $0.75 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>); **b)** control toxico *G. catenatum* ( $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>); **c)** dieta mixta *I. galbana* ( $0.75 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>) + *G. catenatum* ( $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>); **d)** dieta mixta *I. galbana* ( $0.75 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>) + *G. catenatum* ( $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) (Microscopio Olympus BX41, 100 X).

### 7.13.2 Músculo, Manto y Branquia

Los organismos expuestos al dinoflagelado tóxico también presentaron daños en otros tejidos. En la figura 24 se muestran las alteraciones en: músculo, branquia y manto en los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* ( $0.75 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>) + *G.*

*catenatum* ( $30 \times 10^3$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ) comparado con los tejidos del control no tóxico. Es importante aclarar que no se presentan las alteraciones con la dieta mixta con *G. catenatum* ( $3 \times 10^3$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ) ni con el control tóxico porque los daños son similares, pero con un efecto mayor en la dieta mixta con la mayor concentración de *G. catenatum*. En la fig. 24a puede observarse un corte transversal del musculo estriado de organismos alimentados con el control no tóxico, en la que se observan las características histológicas propias de un tejido normal. En cambio, en el músculo estriado de los ostiones expuestos a las diferentes condiciones con *G. catenatum* (fig. 24b) se observó aparentemente distrofia muscular caracterizada por la separación de fibras musculares (ocasionada aparentemente por la disminución en volumen), originando espacios intersticiales entre las células musculares indicadas con las flechas en color negro; también se indica edema en algunas células musculares (flechas en color azul). En la fig. 24c se muestran filamentos branquiales de ostiones alimentados con el control no tóxico, mientras que en la fig. 24d, se muestran los mismos de ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* ( $0.75 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ) + *G. catenatum* ( $30 \times 10^3$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ). Estas estructuras también sufrieron un daño por la exposición a las células tóxicas, se observa la pérdida de cilios branquiales e inflamación del tejido debido a exfoliación y desorganización de las células epiteliales de los arcos branquiales. Además, a través de inspección macroscópica y microscópica, se detectaron lesiones en el manto (melanosis, caracterizada porque las células toman una coloración café), principalmente en los ostiones alimentados con el control tóxico y con la dieta mixta de *I. galbana* ( $0.75 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ) + *G. catenatum* ( $30 \times 10^3$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ), en la imagen se señalan con las flechas en color negro la apariencia microscópica (fig. 24f).



**Figura 24.** Cortes de diferentes tejidos en juveniles de *C. gigas* de  $3 \pm 1$  mm, expuesto a *G. catenatum* teñidas con hematoxilina-eosina. Músculo estriado: **a)** organismo control alimentados con *I. galbana* ( $0.75 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ); **(b)** dieta mixta *I. galbana* + *G. catenatum* ( $30 \times 10^3$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ). Branquia **c)** organismo control alimentados con *I. galbana* ( $0.75 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ); **(d)** dieta mixta *I. galbana* + *G. catenatum* ( $30 \times 10^3$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ). Manto **e)** organismo control alimentados con *I. galbana* ( $0.75 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ); **(f)** dieta mixta *I. galbana* + *G. catenatum* ( $30 \times 10^3$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ) (Microscopio Olympus BX41, a 100 X).

## 7.14 Análisis histológico en juveniles de *C. gigas* de $50 \pm 10$ mm

### 7.14.1 Glándula digestiva y otros tejidos

En la figura 25 a, se muestra la glándula digestiva de los organismos alimentados solo con *I. galbana* (control no tóxico), en las que no hay daño aparente. Se puede apreciar el estado saludable de la glándula con su forma estrellada y los cilios de la cara interna del epitelio intactos. En figura 25b y c se muestra el daño promovido en la glándula por la ingestión de *G. catenatum* en ostiones de  $50 \pm 10$  mm de talla expuestos a la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum*  $6 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>. El daño tisular observado fue muy similar al daño encontrado en los organismos alimentados solo con el dinoflagelado (control tóxico) por lo tanto, solo se presentan las imágenes correspondientes a la dieta mixta. En ambas condiciones, los ostiones presentaron una disminución considerable en la altura de las células de absorción de los túbulos de la glándula digestiva (como se indica en la figura con flechas en color negro), con exfoliación aguda del epitelio digestivo y migración de las células de absorción al lumen de la glándula (como se indica en la figura con flechas en color rosa). Además, se observó infiltración de hemocitos, pérdida de los cilios del epitelio de los túbulos digestivos que rodean el lumen (cara interna) y un aumento en el número de hemocitos en el tejido conectivo que rodea los túbulos.

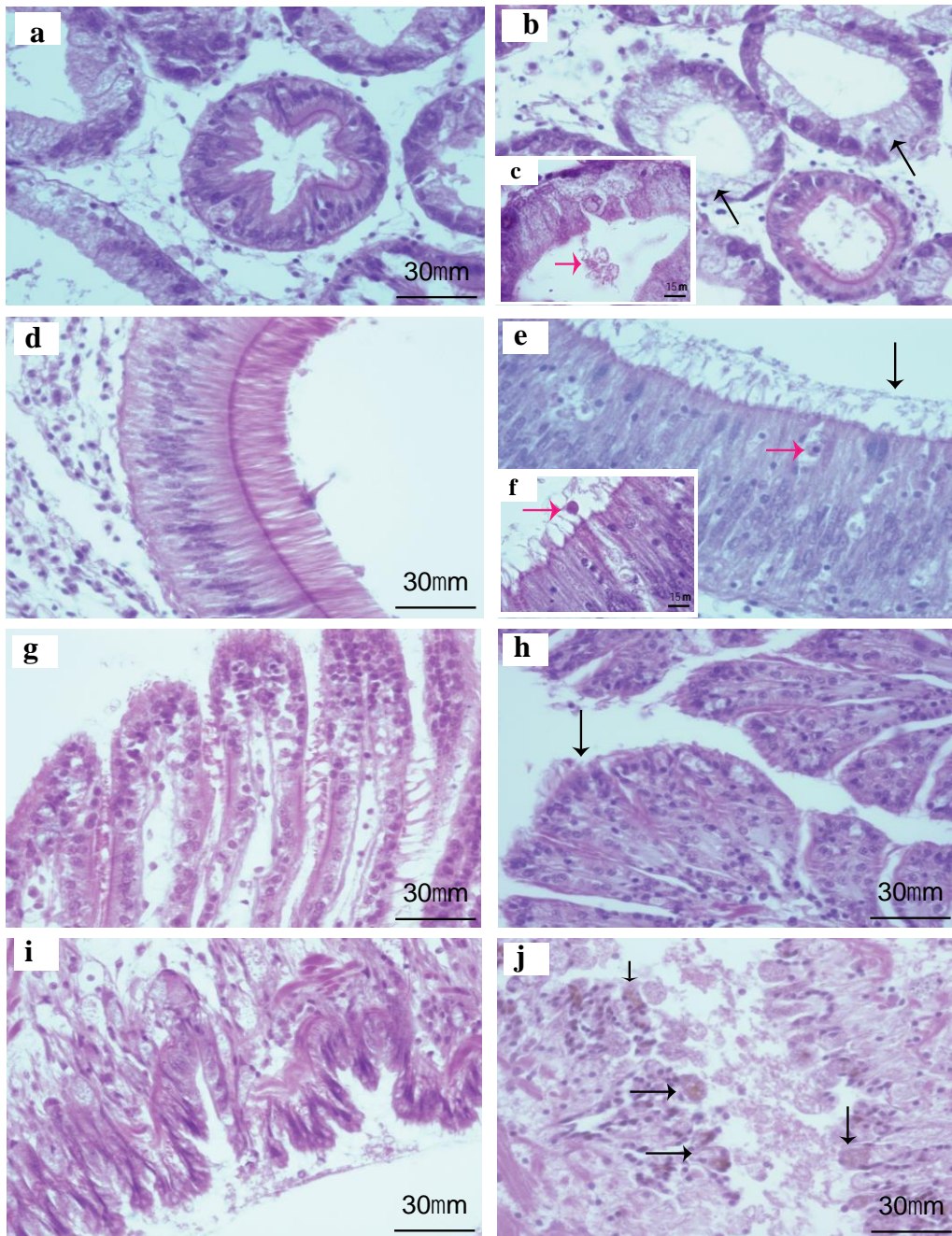
Otro tejido que presento alteraciones tisulares en organismos expuestos al dinoflagelado tóxico fue el intestino; es importante señalar que el epitelio intestinal consiste de una sola capa de células epiteliales ciliadas y no ciliadas expuesto sobre una lámina basal, con células caliciformes intercaladas entre ellas. En la fig. 25d se muestran el epitelio intestinal



de los organismos alimentados con el control no tóxico, en el que no se observa daño: los cilios del interior del lumen del intestino se presentan intactos y no se observan hemocitos en diapédesis. En las figuras 25e y f, se muestra el daño en los ostiones causado por la ingestión de *G. catenatum*. Se identificaron las siguientes alteraciones: inflamación del tejido, diapédesis o infiltración de hemocitos (atravesan el epitelio intestinal hasta el lumen), además, pérdida ciliar, desestabilización del tejido (espacios vacíos, por donde atravesaron los hemocitos) y desorganización de las células epiteliales.

En la figura 25g, se muestra la organización normal de las branquias de los organismos alimentados con el control no tóxico, mientras que en la fig. 25h, se presentan cortes del intestino de ostiones alimentados con *G. catenatum* (dieta mixta y el control tóxico). En estos cortes se pudo identificar desorganización del epitelio e infiltración de hemocitos a nivel del tejido conjuntivo, además de alteraciones en los filamentos branquiales, fusión y pérdida de la ciliatura.

El manto de los ostiones expuestos al dinoflagelado también presentaron daños a nivel de tejido, principalmente melanosis. En la figura 25i, se muestra una fotografía del manto de organismos expuestos a condiciones normales en el que se observan las características histológicas propias de un tejido normal, mientras que en la fig 25j, se ejemplifica el daño provocado en los ostiones expuestos al dinoflagelado (dieta mixta y contro tóxico), en estos cortes se puede observarse melanosis (flechas en color negro).



**Figura 25.** Histopatología de varios tejidos de *C. gigas* de  $50 \pm 10$  mm de talla, teñidas con hematoxilina-eosina. Glándula digestiva: (a) organismo control alimentados con *I. galbana* ( $2 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>), (b) y (c) organismo alimentados con *I. galbana*  $2 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup> y *G. catenatum*  $6 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>; Intestino: (d) organismo control alimentados con *I. galbana* ( $2 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>), (e) y (f) organismo alimentados con *I. galbana*  $2 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup> y *G. catenatum*  $6 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>; Branquia (g) organismo control alimentados con *I. galbana* ( $2 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>) y (h) organismo alimentados con *I. galbana*  $2 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup> y *G. catenatum*  $6 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>; Manto (i) organismo control alimentados con *I. galbana* ( $2 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>) y (j) organismo alimentados con *I. galbana*  $2 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup> y *G. catenatum*  $6 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>. Microscopio olympus BX41, a 40 X y 100 X (c y f).

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Observaciones sobre el comportamiento alimenticio y tasas de aclaramiento en juveniles de *Crassostrea gigas*

Es bien conocido que en moluscos bivalvos las toxinas PST se acumulan en los tejidos a través del proceso de alimentación. Varias investigaciones se han enfocado al estudio del efecto de la ingesta de dinoflagelados productores de estas toxinas, y abarcan un amplio abanico de temáticas, desde el comportamiento alimenticio (Shumway, 1990; Bougrier et al., 1997; Wilsh et al., 1998, Gainey y Shumway, 1990; Hegaret et al., 2007), la cinética de acumulación (Gainey y Shumway, 1990; Laabir et al., 2007), los mecanismos de depuración (Gainey y Shumway, 1990; Guégen et al., 2008) hasta los daños citológicos (Wikfors, 2005). En este estudio, *C. gigas* fue expuesto durante 24 horas (exposición aguda) y por un periodo de 14 días (exposición subcrónica) a diferentes concentraciones de *G. catenatum*, tratando de emular (con sus limitaciones) el escenario al que se enfrentan los organismos en el ambiente marino durante su primer contacto en un evento de marea roja o FAN, dando seguimiento a los cambios que le suceden cuando está expuesto durante un tiempo prolongado a dichos eventos.

En este sentido, cuando *C. gigas* está expuesto a células tóxicas suceden cambios visibles en el comportamiento alimenticio tanto en juveniles de  $3 \pm 1$  mm como en aquellos de  $50 \pm 10$  mm, en tratamientos en dieta mixta y solo el dinoflagelado como son: cierre inmediato de valvas, producción de pseudoheces y moco, retracción del manto y disminución de la tasa de aclaramiento. Esta respuesta en comportamiento puede considerarse como una

manifestación de cambios fisiológicos inducidos por este dinoflagelado. Así mismo, los cambios en comportamiento alimenticio antes mencionados también han sido registrados en otras especies de moluscos bivalvos expuestos a dinoflagelados tóxicos (Bardouil et al., 1996; Bougrier et al., 1997; Blanco et al., 1997; Wilsh et al., 1998; Lassus et al., 2000; Laabir et al., 2007), por lo que los resultados obtenidos en este trabajo corroboran esta información.

Por su parte Shumway (1991), indica que cuando los organismos son expuestos a una concentración de partículas por arriba de su límite de saturación, son capaces de controlar la cantidad de material ingerido haciendo uso de diferentes estrategias: a) reduciendo el tiempo de bombeo (comportamiento de alimentación discontinua), b) reduciendo sus tasas de aclaramiento, y c) incrementando el material rechazado en forma de pseudoheces. Este comportamiento concuerda con el trabajo reportado por Siu-Chung et al. (2001), en el que *Chlamys nobilis* y *Ruditapes philippinarum* al ser alimentados con una mezcla de *Alexandrium tamarense* (30-40  $\mu\text{m}$ ) y *Thalassiosira pseudonana* (5-6  $\mu\text{m}$ ) presentaron tasas de aclaramiento similares; las almejas no fueron capaces de diferenciar entre las dos especies de microalgas. Por su parte, Laabir et al. (2007) reportaron para *C. gigas* tasas de aclaramiento de *A. catenella* de 0.34 ( $1 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$ ) y de 0.26 para *A. minutum* ( $2 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$ ) en un periodo de 24 horas; estos datos son similares a los encontrados en este trabajo con *G. catenatum* a  $3 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$ . Además, Bardouil et al. (1996) demostraron que la inclusión de un 10 % del dinoflagelado tóxico *A. tamarense* en una dieta produce una reducción del 20 % en la tasa de aclaramiento de *C. gigas*.

En este trabajo, observamos una gran cantidad de microalgas no filtradas a las 24 horas post-exposición con las dieta mixtas de *I. galbana* +  $3 \times 10^3$  y  $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> de *G. catenatum* (T3), lo que indica que la tasa de aclaramiento disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) al incrementar la concentración del dinoflagelado en la dieta. Aunque el tamaño de *G. catenatum* (65-43  $\mu\text{m}$ ) es entre 8-10 veces mayor que el de *I. galbana* (4-5  $\mu\text{m}$ ), el ostión fue capaz de ingerir las dos microalgas ya que al realizar los conteos celulares a partir del agua de las unidades experimentales se observó una disminución en el número de las dos microalgas, esto también se corroboró al incluir la dieta con sólo el dinoflagelado (control tóxico). El cierre parcial de valvas y la producción de pseudoheces son un indicativo de que *C. gigas* reguló la ingestión de partículas. Con esto se puede decir que en una mezcla de estas microalgas, el ostión no selecciona las células con base en su tamaño, sin embargo, se observó una preferencia por ingerir *I. galbana*. Este comportamiento ha sido observado en otros estudios, en los que se menciona que los bivalvos hacen una selección preingestiva que no necesariamente depende del tamaño celular, sino de otros factores como la forma de la célula, su composición bioquímica o la secreción de algún metabolito (Bougrier, 2003). De igual forma, se puede pensar que *C. gigas* no es capaz de diferenciar el dinoflagelado tóxico de una microalga no tóxica, ya que al realizar el análisis microscópico de las pseudoheces se observaron ambas ó también a *I. galbana* embebida en el mucus, sin embargo, cabe aclarar que en las muestras observadas dominó el dinoflagelado.

En general, el tratamiento con la concentración más alta del dinoflagelado ( $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>)<sup>1</sup>) mostró un mayor efecto en el comportamiento alimenticio de *C. gigas*, revelando que un periodo de 24 horas (exposición aguda) no es suficiente para que los organismos se

aclimaten a la condición. En cambio, después del periodo inicial y con concentraciones menores del dinoflagelado ( $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>), *C. gigas* demostró capacidad para aclimatarse a la dieta tóxica, ya que las tasas de aclaramiento fueron mayores y la formación de pseudoheces no perduró hasta finalizar el experimento. Este mecanismo de protección a través de la regulación en la tasa de aclaramiento o remoción de las células tóxicas, puede permitir el aprovechamiento de la energía que los dinoflagelados proporcionan como fuente de alimento además, de evitar el daño por la ingesta de toxinas. Sin embargo, aun no es claro si el efecto negativo sobre la conducta de alimentación fue causado por la presencia de la PST, otros compuestos celulares o debido al tamaño de las células del dinoflagelado considerando el tamaño de *I. galbana* usado como control.

## **8.2 Efecto de *G. catenatum* en la expresión de genes de estrés, defensa antioxidante y detoxificación celular en *C. gigas* de $3 \pm 1$ mm**

Las bases moleculares de la respuesta de los organismos a las toxinas de microalgas y dinoflagelados (en especial, de dinoflagelados productores de PST) son poco conocidas en moluscos bivalvos. En este trabajo se seleccionaron cinco genes con diferentes funciones, de los que uno o todos podría resultar ser una herramienta sensible para detectar cambios cuando los ostiones estén expuestos a los dinoflagelados tóxicos.

En términos generales, cuando *C. gigas* fue expuesto a *G. catenatum*, los cambios observados fueron dependientes tanto del tiempo de exposición como de la dosis utilizada (número de células proporcionadas del dinoflagelado), particularmente durante la exposición subcrónica. Aunque en los ostiones alimentados con *I. galbana* (control no

tóxico) los niveles basales de expresión exhibieron cierta variabilidad, estos cambios fueron mínimos durante el transcurso del bioensayo. Sin embargo, los cambios observados en el nivel de expresión relativa en los organismos tratados (tiempo dosis-dependiente), sugieren una relación directa con la ingestión del dinoflagelado tóxico. Por lo tanto, la magnitud de dichos cambios podría tener su base en la susceptibilidad particular del gen (o genes) a cualquier componente del dinoflagelado y no solo a la presencia de las toxinas PST.

En los mecanismos de señalización para el reconocimiento de agentes extraños, en primer lugar sucede la interacción con receptores celulares para iniciar la respuesta de defensa, realmente no requiere la participación de los productos obtenidos mediante la activación transcripcional. Las primeras respuestas asociadas a inductor-receptor son: la alteración en el flujo de iones a través de la membrana, la fosforilación y desfosforilación de proteínas específicas de la célula, y la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO). Este último proceso sucede principalmente durante los primeros 2-5 minutos de la respuesta y se conoce como estrés oxidativo (Manduzio et al., 2005). Las ERO actúan como mensajeros secundarios, activando la transcripción de genes específicos, probablemente implicados en los procesos de detoxificación y protección al daño celular generado por el estrés oxidativo (Manduzio et al., 2005). En este estudio se observó que la respuesta de defensa inmediata del ostión (bioensayo de exposición aguda) se presentó alterando el nivel de expresión de los diferentes genes involucrados en respuesta a estrés, antioxidante, detoxificación y sistema inmune estudiados. Sin embargo, a lo largo de una exposición subcrónica el monitoreo de dichos genes permitieron observar su comportamiento a mediano plazo, y como éste afecta a los organismos.

Las enzimas antioxidantes han sido propuestas como marcadores ambientales para evaluar el impacto que genera el estrés oxidativo por metales pesados y algunos xenobióticos orgánicos (Halliwell y Gutteridge, 1999; Tomanek, 2011). La enzima superóxido dismutasa (SOD), es un importante componente de la defensa antioxidante en la mayoría de las células expuestas a oxígeno. Esta enzima protege a la célula de las reacciones dañinas provocadas por el radical superóxido ( $\bullet\text{O}^{-2}$ ), convirtiéndolos a una forma menos peligrosa al dismutar al radical superóxido a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Buggr et al., 2007). Durante las primeras 6 horas, el nivel de transcripción del gen que codifica la enzima SOD (*sod-cu/zn*) no fue alterado con  $3 \times 10^3$  cel  $\text{mL}^{-1}$ , sin embargo, el incremento fue observado después de 12 h de exposición. Este resultado podría indicar que el número de células de *G. catenatum* ( $3 \times 10^3$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ) causa una efecto positivo neto sobre la expresión de *sod-cu/zn*, a pesar de que se da una adaptación de la expresión (aumento) que equilibra las condiciones para permitir la restauración del estado de homeostasis en los ostiones expuestos. Así mismo, se encontró que después de un breve período de exposición a  $30 \times 10^3$  cel  $\text{mL}^{-1}$  de *G. catenatum*, la transcripción de *sod-cu/zn* fue reprimida; los efectos nocivos fueron evidentes dado que el efecto de represión bajo esas condiciones fue continuo (desde el inicio del bioensayo y hasta las 24 h), recuperándose lentamente. No obstante lo anterior, en una exposición subcrónica se observó un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) en el nivel de expresión del gen en los organismos alimentados con la dieta mixta ( $30 \times 10^3$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ) y en los organismos alimentados con el control positivo, comparado con los alimentados con la dieta mixta de  $3 \times 10^3$  cel  $\text{mL}^{-1}$ . Al mismo tiempo, se destaca que el nivel de expresión de *sod-cu/zn* en los ostiones alimentados con el control tóxico, fue mayor, independientemente del tiempo de exposición, presentando un punto máximo a los 7 días



de exposición. La diferencia entre estas dos condiciones experimentales es la presencia de *I. galbana* en la dieta, lo que sugiere que la presencia de una microalga no tóxica mitiga de alguna manera el daño en los ostiones, al disminuir la magnitud del impacto. El gen que codifica para *sod-cu/zn* está involucrado en la respuesta celular a muchos estresores ambientales y fisiológicos, por tanto ha sido ampliamente estudiado en respuesta al estrés oxidativo en moluscos bivalvos; en *C. gigas* se ha reportado principalmente después de la exposición a metales pesados (Jenny et al., 2002; Tomanek, 2011) termal (Meistertzheim et al., 2007) mortalidad de verano (Huvet et. al, 2004) exposición a plaguicidas (Boutet et al., 2004; Tanguy et al. 2005; Colin et al. 2010), exposición al dinoflagelado tóxico *P. lima* (Romero-Geraldo y Hernández-Saavedra, 2012) y exposición a brevetoxinas (Mello et al, 2013) donde encontraron que el nivel de expresión de dicho gen aumentó después del reto a estas condiciones de estrés. Como se mencionó anteriormente este gen codifica para la enzima SOD, capaz de disminuir los efectos dañinos de los EROS, y por tanto es considerada como una de las enzimas antioxidantes primarias. Existe una fuerte correlación entre ficotoxinas y el daño oxidativo (Romero-Geraldo y Hernández-Saavedra, 2012; Estrada et al., 2007). Manduzio et al. (2005) señalan que la represión de la *sod-cu/zn* puede indicar una pérdida en la capacidad de protección de la célula contra el radical superóxido, además, estudios recientes demostraron un aumento en la producción de EROS en *C. gigas* expuesto a *A. minutum* productor de PST (Haberkorn et al., 2010a, b).

De esta manera, la sobreexpresión del gen *sod-cu/zn* en los ostiones tras la alimentación con *G. catenatum* es indicativa de la eliminación de ERO, así como de su papel como molécula antioxidante; esta es una estrategia para compensar el daño a nivel celular, aumentando la abundancia de transcritos, lo que podría incrementar la resistencia de los

organismos. Es importante señalar que esta es la primera vez que se reporta un incremento del nivel de expresión de un gen que codifica una enzima antioxidante, en respuesta a la exposición de células completas de *G. catenatum* en *C. gigas*.

La glutatión S transferasa (GST-S) pertenece a una gran superfamilia de enzimas multifuncionales que participan en la detoxificación celular, cataliza la conjugación del glutatión (GSH) con compuestos electrófilicos con una amplia gama de agentes endógenos y xenobióticos, incluyendo sustancias tóxicas y productos del estrés oxidativo (Boutet et al., 2004; Manduzio et al. 2005).

En este trabajo, el nivel de expresión del gen *gst-s* mostró diferencias significativas entre los ostiones expuestos a las dietas mixtas *I. galbana* + *G. catenatum*, control tóxico y control no tóxico, entonces debido al papel importante que juega este gen en los procesos de detoxificación celular, probablemente esté involucrado en la regulación y metabolismo de los ostiones para eliminar las toxinas PST. En las dietas mixtas *I. galbana* + *G. catenatum* y el control tóxico el nivel de expresión de *gst-s* fue bajo durante las primeras 6 h de exposición, sin embargo, incrementó significativamente ( $p < 0.05$ ) después de las 12 h en ambas condiciones. Se ha documentado, en este y en otros trabajos, que las primeras respuestas de *C. gigas* ante la presencia de *G. catenatum* van desde la disminución de la tasa de alimentación hasta el cierre de las valvas (Estrada et al., 2007), aunado a la disminución de palatabilidad del alimento como mecanismo de resistencia a daño tisular (Bardouil et al., 1993; Wildish et al., 1998; Lassus et al., 2004). Por lo tanto, este comportamiento podría explicar el bajo nivel de expresión durante las primeras horas; en el

caso de una exposición subcrónica, el incremento en el nivel de expresión se encontró en la dieta mixta de  $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> y control tóxico en el día 7 de exposición.

La sobreexpresión de *gst-s* a largo plazo (exposición subcrónica) también ha sido reportada en *C. gigas* expuesto a contaminantes (Boutet et al., 2004). Las adaptaciones bioquímicas que involucran una respuesta de expresión génica contra xenobióticos, como la actividad GST, podría explicar en parte la resistencia de los consumidores a las amenazas químicas de los alimentos, además de proporcionar información sobre los mecanismos enzimáticos involucrados (Vrolijk y Targett, 1992; Whalen et al., 2008; Tomanek 2011). La inducción de *gst-s* con una dieta aleloquímica podría servir como un mecanismo de ajuste adicional de protección contra la toxicidad (Vrolijk y Targett, 1992; Whalen et al., 2008); este fenómeno podría estar sucediendo en nuestro sistema de estudio (dinoflagelado tóxico-ostión). Las diferencias en el nivel de transcripción entre los tratamientos podrían tener su base en los procesos de desintoxicación que normalmente se asocian con estrés (Manduzio et al., 2005; Lesser, 2006; Estrada et al., 2007).

Por otro lado, se ha encontrado que los ostiones presentan una alta acumulación de tóxicos en los tejidos (toxinas o metales) después de siete días de exposición (Shumway, 1991; Bricelj y Shumway, 1998); esto concuerda con nuestra observación del aumento del nivel de transcripción de *gst-s*. Por tanto, la sobreexpresión recurrente de dicho gen podría asociarse a un aumento de la resistencia del organismo a factores de estrés, incluyendo compuestos tóxicos (Vrolijk y Targett, 1992). Los resultados obtenidos contribuyen a una mejor comprensión de la función de *gst-s* y la presencia de mecanismos de resistencia hacia un dinoflagelado tóxico en su dieta.

También se dio seguimiento a la expresión del gen de la glutamina sintetasa (GS) y se encontró que fue regulado por la exposición al dinoflagelado en las dietas mixtas y en el control tóxico. La glutamina sintetasa (GS) es una enzima que juega un papel central en el metabolismo del nitrógeno, catalizando la reacción química entre el glutamato y el amonio para la formación de glutamina; su biosíntesis ayuda a limpiar de amonio algunos tejidos ya que convierte el nitrógeno en urea y aminoácidos, participa en la biosíntesis de nucleótidos, además, desempeña un papel importante en el sistema nervioso central donde recicla neurotransmisores de ácido glutámico (Keepeler, 2007). GS se encuentra en una amplia gama de organismos, incluyendo microorganismos, plantas y animales. En moluscos, la capacidad para la biosíntesis de glutamina es generalmente débil o ausente, sin embargo, también puede actuar como un mecanismo de desintoxicación de cationes de amoníaco (Tanguy *et al.* 2005). En respuesta al estrés generado por la exposición al dinoflagelado tóxico, los ostiones exhibieron diferentes resultados en la expresión de *gs* bajo exposición aguda y subcrónica, en términos de magnitud.

El efecto perjudicial de la presencia de las células tóxicas en los ostiones, considerándose hace evidente debido a la represión del nivel de expresión de *gs* a las 24 h post-exposición tanto en las dietas mixtas *I. galbana* + *G. catenatum* como en el control tóxico. El nivel más alto de expresión del gen *gs* se observó durante una exposición subcrónica. Al igual que con los otros genes mencionados anteriormente, el incremento del nivel de expresión de *gs* resultó altamente regulada tanto por la concentración de células de *G. catenatum* como por el tiempo de exposición. La sobreexpresión del gen que codifican para GS, una proteína de respuesta a estrés, ha sido estudiada en diversas especies de moluscos bivalvos como una respuesta ante la presencia de hidrocarburos (Boutet *et al.*, 2004a), hipoxia

(David et al., 2005), plaguicidas (Boutet et al., 2004; Tanguy et al., 2005; Collin et al., 2010) y exposición al dinoflagelados tóxicos *P. lima* (Romero-Geraldo y Hernández-Saavedra, 2012), y se ha observado que juega un papel fundamental en la resistencia de los organismos a estos factores de estrés. Recientemente, Bao *et al.* (2013) reportaron un incremento en el nivel de expresión de *gs*, en diferentes tejidos de la almeja *Tegillarca granosa* durante una exposición a *Vibrio challenge*, encontrando una mayor sobreexpresión en hemocitos y manto, por lo que mencionan que *gs* podría estar involucrado en reacciones inmunes.

La glutamina producida por la GS es necesaria para la síntesis de aminoácidos, purinas y pirimidinas, que son moléculas esenciales en la síntesis de proteínas (Keeper, 2007). En nuestra investigación observamos que GS se comporta como una proteína constitutiva e inducible a condiciones de estrés, por lo que el aumento en la expresión de *gs* podría ser el reflejo de un aumento en la síntesis de proteínas, lo que resulta esencial para la regulación de la homeostasis en los organismos. También podría estar implicada en el mecanismo de defensa inmune en respuesta al dinoflagelado tóxico, sin embargo, resulta arriesgado afirmarlo puesto que hacen falta más estudios para comprobar esta función.

La proteína de unión a LPS y  $\beta$ -1,3 glucano (LGBP) desempeña un papel crucial en la inmunidad innata de invertebrados (Girón-Pérez, 2010). La unión de lipopolisacárido y/o  $\beta$ -1,3 glucano a la LGBP, activa la cascada pro-fenoloxidasas, que es una respuesta general de estrés de naturaleza abiótica o biótica en invertebrados como *C. gigas* (Montagnani et al., 2007; Girón-Pérez, 2010). El mecanismo de defensa del hospedero puede dividirse en tres pasos esenciales: detección del microorganismo infeccioso, activación de las vías de

señalización intracelular y, finalmente, la activación del mecanismo efector (Girón-Pérez, 2010). La LGBP es una proteína de fase aguda que juega un papel crítico en las interacciones parásito-huésped, y es esencial en la respuesta general del sistema inmune innato de los invertebrados. Los resultados de esta tesis indican una respuesta diferencial en el nivel de expresión del gen que codifica la LGBP (*lgbp*), relacionada directamente con la concentración del dinoflagelado tóxico y con el tiempo de exposición; observamos una sobreexpresión de *lgbp* desde las primeras horas de inicio del bioensayo como bajo exposición subcrónica (14 días de exposición) en los ostiones alimentados en dieta mixta con *I. galbana* +  $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> de *G. catenatum*. En los ostiones alimentados con el control tóxico (sólo *G. catenatum*), la activación de la respuesta inmune protectora, sugiere que los ostiones son capaces de identificar al dinoflagelado como un elemento extraño, que podría funcionar como un invasor potencial, y no ser necesariamente una respuesta asociada al deterioro fisiológico provocado por la toxina presente en *G. catenatum*. Sin embargo, dado el diseño experimental aplicado en este trabajo, así como la pregunta específica (el efecto de las microalgas como en un fenómeno FAN y no el efecto aislado de la toxina), para aislar e identificar el o los componentes de *G. catenatum* que pudieran ser los responsables de esta respuesta sería necesario fraccionar al dinoflagelado, de la misma forma como lo plantea Matus (2013) en su trabajo, al analizar el efecto de varias especies del género *Prorocentrum* y sus componentes (de forma aislada) en el perfil proteico 2D de ostiones juveniles de 3-5 mm. Aunque muchos estudios han evaluado los efectos dañinos de las algas y sus toxinas sobre el sistema inmunológico de bivalvos, las interacciones biológicas entre ellos son poco conocidos, sobre todo en un nivel molecular. El gen *lgbp* ha sido identificado en bibliotecas SSH de *C. gigas* expuesto a hidrocarburos donde observaron una sobreexpresión (Boutet et al., 2004) al igual que en una exposición a

parásitos protozoarios (Tanguy, 2004). Este trabajo proporciona la primera evidencia experimental de que la exposición de *C. gigas* a células tóxicas de *G. catenatum* incrementa (temporalmente) la expresión de *lgbp* y podría desempeñar un papel crítico en la interacción *C. gigas*-*G. catenatum*.

El citocromo P450 (CYP por su abreviación en inglés) es una enorme y diversa superfamilia de hemoproteínas encontradas en bacterias, archaea y eucariotas. Las proteínas del CYP usan un amplio rango de compuestos (exógenos y endógenos) como sustrato de sus reacciones enzimáticas. Por lo general, forman parte de la cadena de transferencia de electrones con multicomponentes denominadas sistema contenedoras de P450. La reacción más común catalizada por el citocromo P450 es una reacción de monooxigenasa, es decir, la inserción de un átomo de oxígeno molecular ( $O_2$ ) en un sustrato orgánico (RH) a la vez que otro átomo de oxígeno es reducido a agua (Toledo-Silva et al., 2008).

El citocromo P450 constituye la primera defensa enzimática contra compuestos xenobióticos. La biotransformación de xenobióticos se realiza básicamente en dos fases: fase I, catalizada principalmente por el sistema de monooxigenasas dependiente del citocromo P450. Fase II, en la que participan una serie de transferasas que catalizan reacciones de conjugación de los xenobióticos con diversas moléculas de naturaleza endógena como ácido glucorónico, sulfatos, acetato, el tripéptido glutatión o algunos aminoácidos (Medeiros et al, 2008). Estas enzimas metabolizan una amplia variedad de sustratos, tales como ácidos grasos, hormonas y xenobióticos (Boutet et al., 2004). En organismos marinos, después de la exposición a aleloquímicos de corales gorgonia (Vrolijk y Targett, 1992) y a muchos otros contaminantes que típicamente se liberan de forma continua en el medio ambiente como hidrocarburos aromáticos policíclicos, metales

pesados (por ejemplo, Pb y Cu), y los productos químicos disruptores endocrinos (Tanguy et al., 2002; Boutet et al., 2004),

En este trabajo, la sobreexpresión del gen *cyp356A1* se encontró sobreexpresado en los ostiones alimentados con las dietas mixtas *I. galbana* + *G. catenatum* y el control tóxico principalmente en exposición subcrónica. Estas observaciones sugieren una participación importante de este gen en los procesos de detoxificación celular en los ostiones expuestos al dinoflagelado. De la misma forma que en los genes mencionados anteriormente, los cambios en el nivel de expresión de *cyp356A1* dependen tanto del tiempo de exposición como de la concentración de los dinoflagelados en los sistemas de ensayo.

Varios genes de esta superfamilia son altamente inducibles, particularmente por xenobióticos que se unen a receptores intracelulares específicos y por tanto modulan la expresión génica (Toledo-Silva et al., 2008). El gen que codifica para la proteína de la citocromo P450 principalmente la isoforma *cyp356A1* ha sido identificado previamente en *Crassostrea gigas*, encontraron un incremento en su nivel de transcripción en ostiones expuestos a efluentes domésticos (Toledo-Silva et al., 2008; Medeiros et al., 2008). Dicho gen, tiene gran similitud con la familia CYP17, que se asocia con el metabolismo de los esteroides y una menor similitud con la familia CYP1, que comprende CYP1A, comúnmente asociada con el metabolismo de hidrocarburos aromáticos policíclicos (Toledo-Silva et al., 2008). A pesar del debate que existe si la isoforma *cyp356A1* participa en procesos de biotransformación, Mello et al. (2012) reportaron una sobreexpresión de este gen en hemocitos de *C. gigas* expuesto a brevetoxinas (neurotoxinas) por lo que dedujeron que el gen *cyp356A1* tiene el potencial para participar en los procesos de



detoxificación durante el metabolismo de dichas toxinas. Por otro lado, una exposición a toxinas PST (STX pura) en hemocitos de *C. gigas* condujo a una represión en la transcripción de gen *cyp356A1* (Mello et al., 2013). En cambio, en el presente trabajo encontramos altamente sobrepresado este gen principalmente en los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum*  $30 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup> (35 veces por arriba del control no tóxico), sin embargo, es importante recalcar que en este estudio se utilizaron las células completas del dinoflagelado. Es sabido que los bivalvos acumulan y metabolizan las toxinas PST, lo que resulta en metabolitos conjugados, oxidados, reducidos e/o hidrolizados (Bricelj y Shumway, 1998; Choi et al., 2006). Sin embargo, la biotransformación de la PST asociada a la actividad de la CYP450 ha sido escasamente descrita en *C. gigas*, por lo tanto, el incremento en el nivel de expresión de *cyp356A1* observado en nuestro trabajo, abre la oportunidad de estudiar cómo está implicada la enzima, y cómo ocurre esta asociación. Además, el reciente genoma secuenciado de *C. gigas* reveló que contiene una gran número de genes *cyp* (Zhang et al., 2012), por lo que la expresión de otras isoformas CYP deberían también examinarse antes de establecer conclusiones definitivas.

### **8.3 Efecto de *G. catenatum* en la expresión de genes de regulación del ciclo celular, citoesqueleto, inflamación, apoptosis y cadena respiratoria en *C. gigas* de $3 \pm 1$ mm**

A pesar de existen extensos estudios acerca de efectos adversos mediados por PST, aún puede considerarse que hay poca información sobre su efecto en la expresión de genes,

conocimiento que permitiría comprender detalladamente los mecanismos de la toxicidad inducida por este tipo de toxinas.

En este estudio se encontró un incremento en el nivel de transcripción de algunos genes que participan en la regulación del ciclo celular (*p21*, *p53*, *caf p55* y *ef2*), en procesos de inflamación (*casp1*) y del citoesqueleto (*act* y *tub β*), como respuesta a la exposición de *C. gigas* a *G. catenatum*. Los genes estudiados fueron seleccionados con base en sus papeles fisiológicos y porque pueden funcionar como una herramienta sensible para detectar cambios cuando los ostiones son expuestos a dinoflagelados tóxicos. En todos los tratamientos, los cambios en el nivel de expresión resulto tiempo- y concentración-dependiente. Por otro lado, la consideración de un control tóxico en el diseño experimental (tratando de aislar el efecto de la toxinas en una dieta que consiste solamente en *G. catenatum*, considerada como control positivo a la toxina), confirma el impacto del dinoflagelado tóxico *per se* sobre los genes estudiados, tomando como base la homeostasis en *C. gigas* (ostiones alimentados con *I. galbana*). Además, como se mencionó anteriormente, la magnitud de los cambios y los efectos particulares pueden tener su base en la susceptibilidad particular de cada gen a las toxinas y/o algún otro componente (o componentes) del dinoflagelado. Con la dieta mixta con la mayor concentración de *G. catenatum* ( $30 \times 10^3$  células mL<sup>-1</sup>), los ostiones no pudieron compensar el daño causado por la exposición, manifestándose como daños en los tejidos (cambios notables en los túbulos de la glándula digestiva, intestino, manto, branquias y el tejido muscular).

Los genes implicados en la regulación del ciclo celular, mostraron diferentes patrones de expresión en comparación con otros genes, principalmente en las dietas mixtas de *I.*

*galbana* + *G. catenatum* con  $3 \times 10^3$  y  $30 \times 10^3$  células mL<sup>-1</sup>. Los genes *ef2*, *p21* y *p55* se sobre expresaron principalmente a los 7 días.

El gen *waf1* o *p21* codifican una proteína que funciona como un potente inhibidor de quinasa dependiente de ciclina (inhibidor de CDK), que se une e inhibe la actividad de los complejos de ciclina CDK2 y CDK4. Por lo tanto, esta proteína funciona como un regulador de la progresión del ciclo celular en la fase G1 controlado por la proteína p53. En esta fase sucede el crecimiento celular con síntesis de proteínas y de ARN, básicamente, es el período que transcurre entre el fin de una mitosis y el inicio de la síntesis de ADN. Tiene una duración de entre 6 y 12 horas, y durante este tiempo la célula duplica su tamaño y masa debido a la continua síntesis de todos sus componentes, como resultado de la expresión de los genes que codifican las proteínas responsables de su fenotipo particular. Durante esta fase la proteína supresora de tumores p53 controla estrechamente la expresión de *p21*; a través de la proteína *p21* se medía la fase de detención del ciclo celular G1 dependiente de p53, en respuesta a una variedad de estímulos de estrés (Tyler et al., 1996; Böttger et al., 2008).

*p53* es un gen supresor de tumores, es una de las proteínas más intensivamente estudiadas y estas pueden regular varias funciones celulares mayores incluyendo transcripción de genes, síntesis de ADN, reparación del ADN, regulación del ciclo celular, apoptosis y muerte celular (Tyler et al., 1996; Chao et al., 2000; Farcy et al., 2008b). Bajo condiciones en las cuales el ADN es dañado, *p53* media la reparación del ADN, detención del ciclo celular y apoptosis, en gran medida a través de la transactivación de genes blanco específicos. La diversidad en las funciones de *p53* son reflejadas en una amplia variedad de genes blanco

que son selectivamente trans activados dependiendo del tipo y severidad del estímulo de estrés y sobre los residuos de aminoácidos específicos de P53 que son fosforilados o acetilados (Culmsee y Mattson, 2005). Un incremento en la proteína P53 a través del ADN dañado conduce a la detención del ciclo celular en G1 y/o G2, dando tiempo para que se dé la reparación del ADN, e inducir a apoptosis si el daño es severo (Culmsee y Mattson, 2005). La detención del ciclo celular involucra la activación transcripcional de p21/WAF1, un inhibidor de cinasa dependiente de ciclina. La expresión de *p53* ha mostrado responder a una variedad de cambios en condiciones ambientales (Tyler et al., 1996; Böttger et al., 2008). Sin embargo, los estudios que se centran en las funciones de reparación del ADN, detención del ciclo celular y apoptosis, son todavía limitados, principalmente porque la falta de información acerca de otras moléculas mediadas por *p53* y estudios de líneas celulares adecuadas para organismos acuáticos, se basan principalmente por lo que hay establecido para los estudios en mamíferos (Chao et al., 2000; Farcy et al. 2008b).

El gen supresor de tumores *p53* se considera que es el principal sensor de estrés genotóxico debido a que es la vía de unión entre el ADN dañado, detención del ciclo celular y la apoptosis (Chao et al., 2000).

Con base a lo anterior, la expresión de los genes *p21* y *p53* fue examinada en los ostiones alimentados con las dietas mixtas de *I. galbana* + *G. catenatum* con  $3 \times 10^3$  y  $30 \times 10^3$  células mL<sup>-1</sup> y el control tóxico (sólo *G. catenatum*), como un marcador para la vía de detención del ciclo celular. La expresión de *p53* fue principalmente regulado después de 7 días de exposición al dinoflagelado.

En los ostiones expuestos a sólo *G. catenatum* también se observó un aumento en el nivel de transcritos de *p21*. Esto sugiere que la detención del ciclo celular en el ostión, a través de la activación transcripcional de *p21*, podría funcionar para prevenir la replicación de las células dañadas. Probablemente estas células son eliminadas vía apoptosis, ya que este proceso desempeña un papel importante en la sucesión y la transmisión de enfermedades en ostiones (Sunila y Labanca, 2003); entonces, la apoptosis podría causar el deterioro fisiológico de los organismo y, al final, la muerte si la exposición al dinoflagelado tóxico perdura por un largo tiempo (exposición crónica).

El factor 1 de ensamblaje de cromatina subunidad p55, es una proteína que actúa en la acetilación de las histonas (histona acetiltransferasa), y está relacionado con la regulación de la transcripción a través de diferentes procesos celulares; el montaje y la maduración de la cromatina están codificados por CAFp55. CAFp55 es una proteína chaperona de histonas que juega un papel crítico en el ensamblaje de la cromatina, que esta acoplado a la replicación y reparación del ADN. Este factor, se compone de tres subunidades diferentes (55, 60, y 150 kDa), de los que la subunidad de 55 kDa es un componente de varios complejos de proteínas involucradas en la remodelación de la cromatina (Taylor-Harding et al., 2004); los eventos de remodelación también están asociados con la reparación del ADN (Meijer y Smerdon, 1999). En este estudio, se encontró que el nivel de transcripción de *caf* p55 alcanzó el valor máximo en al tratamiento con  $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> a los 7 días de exposición. El aumento en la expresión de *caf* p55 se puede relacionar estrechamente con el aumento de la expresión observado en *p21* y *p53*, por lo que puede considerarse la función de estos tres genes es indispensables para el correcto funcionamiento de los mecanismos celulares de la replicación y reparación del ADN. El papel regulador de los factores de

ensamblaje como CAF-1, en el establecimiento de estos estados de la cromatina y su herencia a través del desarrollo del ciclo celular, requiere de un estudio más riguroso.

Con base en la observación de un alto nivel de transcripción observado en este grupo de genes en *C. gigas* expuesto a dieta mixta con  $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> de *G. catenatum*, sugerimos que el tratamiento no induce daño en los puntos de control de reparación del ADN, haciendo posible la restauración de la homeostasis en los organismos. Sin embargo, esto podría no suceder en *C. gigas* expuestos a  $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>, donde la posible alteración de los puntos de control del ciclo celular provoca daño irreversible en el ADN y, por ende, el deterioro de los organismos ya que las lesiones observadas en los tejidos son graves.

El factor de elongación 2 o translocasa, pertenece a la familia de GTPasas, es una enzima que participa en el proceso de elongación durante la síntesis de proteínas. En esta investigación, se observaron niveles elevados de expresión de *ef2* desde el primer día de exposición a *G. catenatum*, comportamiento que coincide aquel observado en *caf p55*, *p21* y *p53*. Por lo tanto, ante esta condición de estrés los ostiones requieren una mayor producción de proteínas para contrarrestar el efecto, lo que se refleja como un incremento en la transcripción de los otros genes. En estudios previos, otros autores han documentado que los factores de transcripción son los primeros en responder a la exposición a neurotoxinas de diatomeas (Salierno et al., 2006; Lefebvre et al., 2009).

En este trabajo, también se observó que el gen *casp1* fue altamente regulado en todos los tratamientos a los 7 d de exposición. La familia de las caspasas desempeña un papel muy importante en la apoptosis. Entre los 14 miembros conocidos de la familia, la caspasa 1 juega un papel crítico en la ejecución del proceso de la inflamación, lo que al final conduce a apoptosis (Chen et al., 2001). Por lo tanto, las lesiones en los tejidos y la infiltración de

hemocitos observados en los ostiones alimentados con *G. catenatum* podrían estar involucrados en la regulación de una respuesta inflamatoria y de apoptosis.

Como consecuencia de la exposición a *G. catenatum* se observó que en *C. gigas* los genes que codifican proteínas del citoesqueleto también fueron modulados. En este estudio, se observó una clara modulación de la expresión del gen de actina (*act*) en relación a la concentración de *G. catenatum* y al tiempo de exposición, a pesar de que generalmente se utiliza como un gen constitutivo. La actina, pertenece a una familia de proteínas altamente conservadas y constitutivamente expresadas en todas las células eucariotas, implicadas en la formación de filamentos, que son el componente principal del citoesqueleto. Esta estructura de soporte celular es una red dinámica de polímeros de actina y una variedad de proteínas asociadas que participan en importantes funciones celulares. Lacoste (2001) reportó cambios en el citoesqueleto por factores de estrés tales como metales pesados y temperatura. En estudios anteriores, se demostró el efecto del parásito *P. marinus* en el reacomodo del citoesqueleto (Gruenheid y Finlay, 2003). Así mismo, Tanguy y Ford (2004) reportaron la sobre-regulación de *act* y *tub* en *C. virginica* y *C. gigas* expuestos a *P. marinus*.

Por otra parte, la tubulina también es un componente importante del citoesqueleto. Los microtúbulos están involucrados en diversos procesos celulares que implican el movimiento de las vesículas secretoras, movimiento de orgánulos, transporte de sustancias intracelulares, así como la división celular (mitosis y la meiosis). El aumento de la expresión de este gen puede asociarse con el estrés generalizado, provocando un aumento en la síntesis de varias moléculas intracelulares, aumentando el transporte a través de las células para tratar de compensar el daño. Los resultados de este trabajo sugieren que el gen *tub*  $\beta$  podría desempeñar un papel importante, pero aún no identificado, en el

reordenamiento de procesos celulares en los ostiones alimentados con *G. catenatum*. Todas estas observaciones sugieren que las diferentes funciones celulares implicadas en la respuesta al estrés tóxico (regulación del ciclo celular y el citoesqueleto) están estrechamente interconectadas.

Las toxinas paralizantes son moléculas estables al calor y altamente hidrofílicas, la célula blanco donde actúan son las células nerviosas y bloquean específicamente los canales de sodio dependiente de voltaje. Debido a su característica hidrofílica no pueden atravesar la membrana celular por lo que se unen de manera reversible al sitio 1 del canal de sodio, bloqueando así el poro (FAO, 2005). Al no poder ingresar a la célula las toxinas PST no puede actuar de manera directa. Sin embargo, el bloqueo promovido podría funcionar como una señal extracelular para fosforilar o desfosforilar proteínas que se encuentran en la membrana, que a su vez activan segundos mensajeros, ocasionando así una cascada de respuestas alterando a nivel celular la expresión de los genes.

La enzima COI pertenece a la clase de las óxido reductasas y cataliza el último paso de la cadena de transporte de electrones, transfiriéndolos a moléculas de oxígeno y reduciéndolos finalmente a agua (Achard-Joris et al., 2006); además, la COI puede contribuir a la protección de la célula por los daños producidos por ROS (Buggr et al., 2007). La exposición a condiciones de estrés (metales pesados, contaminantes, toxinas) podrían requerir una mayor demanda energética para los procesos de reparación tisular, protección celular y procesos de detoxificación, dado que estos modos de protección implican un incremento en el costo energético celular (Li et al., 2002). El gen que codifica la COI fue sobre expresado en los tratamientos de  $3 \times 10^3$  y  $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> a los 7 días de



exposición; esto corrobora la situación de estrés sufrido por los ostiones ante la presencia e ingestión de *G. catenatum*, ya que los ostiones se mantuvieron metabólicamente activos.

Por otra parte, la tripsina es una proteasa que posee funciones reguladoras en diferentes procesos fisiológicos, como la coagulación (Takada et al., 1994), el desarrollo (Konrad et al., 1998), la embriogénesis (Hong y Hashimoto, 1995), la digestión (Neurath, 1984), la inflamación (Hiemstra, 2002) y la respuesta inmune (Gorman et al., 2000). En moluscos bivalvos como el mejillón *M. chilensis* se ha observado un incremento en la actividad de enzimas importantes en la digestión y absorción de nutrientes cuando es alimentado con dinoflagelados productores de toxinas PST *A. catenella* así como un ajuste en la actividad de carbohidrasas (amilasas, laminarasa, celulasa) (Fernández- Reiriz et al., 2008). en este trabajo se encontró que el nivel de transcripción del gen (*tryp*) que codifica para tripsina (TRYP), incremento significativamente en los ostiones alimentados con las dietas mixtas de  $3 \times 10^3$  y  $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> a los 7 días de exposición, mientras que 7 días después (14 días de exposición) la transcripción se reprimió casi completamente. Sin embargo, tomando como base los resultados obtenidos en este trabajo no se podría afirmar que la sobre expresión *tryp* este dada por el cambio en la dieta, ya que para el procesamiento de las muestras y análisis de expresión se procesaron los organismos completos (ostiones de  $3 \pm 1$  mm de tallas), por lo que no se separó la glándula digestiva; en los ostiones de mayor talla (más adelante) no se obtuvieron elementos suficientes para asegurar que el incremento en el nivel de transcrito se deba a un incremento de la capacidad digestiva en presencia del dinoflagelado.

En este trabajo, queda demostrado el efecto tóxico causado por células completas de *G. catenatum*, es importante considerar que subproductos metabólicos distintos de las toxinas

pueden contribuir a la efectos observados afectando a las membranas celulares o sistemas de órganos en particular, que en suma podrían afectar la salud de los organismos y finalmente conducir a la adquisición de una enfermedad. Además, aquí se presenta la primera evidencia de que la exposición a las células tóxicas de *G. catenatum* genera un aumento en el nivel de expresión de genes que codifican proteínas implicadas en varios tipos de respuesta: a estrés, antioxidante, detoxificación, de defensa inmune, inflamación y regulación del ciclo celular. Si bien estos genes son los que responden inmediatamente a un estímulo estresante en los organismos, también se mantienen sobre expresados en un mediano plazo, posiblemente contrarrestando el daño generado.

Así mismo, queda demostrado que en *C. gigas* una baja concentración de *G. catenatum* y/o por un periodo corto de exposición, son suficientes para modular (sobre expresar o reprimir) la expresión de los genes antes mencionados, y que una exposición subcrónica induce cambios mayores en los perfiles de expresión de los genes analizados. Por lo tanto, la tensión inducida por *G. catenatum* durante los eventos naturales, probablemente aumenta la susceptibilidad de los ostiones a la invasión por patógenos oportunistas, por lo que las poblaciones de ostiones (y muy probablemente las de otros moluscos) podrían morir por infecciones secundarias.

Con la información aquí generada, se pueden plantear estudios adicionales, especialmente diseñados, que puedan proporcionar más adelante una mayor comprensión de cómo *G. catenatum* y/o sus toxinas activan/desactivan el sistema de defensa de *C. gigas*. Por su parte, Vasconcelos et al. (2010) señalan que las toxinas producidas por dinoflagelados afectan a la integridad de los organismos acuáticos en las primeras fases de desarrollo, ya

que los invertebrados marinos no tienen sistemas enzimáticos eficaces para la desintoxicación, haciéndolos más susceptibles dadas sus altas tasas metabólicas

#### **8.4 Efecto de *G. catenatum* en la expresión de genes de regulación del ciclo celular, citoesqueleto, inflamación y apoptosis, en glándula digestiva de *C. gigas* de $50 \pm 10$ mm**

La glándula digestiva es el principal órgano blanco donde se acumulan las toxinas PST, de ahí la importancia de monitorear la expresión de los genes seleccionados en este estudio. Además, la glándula digestiva es de particular importancia porque es el sitio donde se lleva a cabo el procesamiento del alimento y de otros compuestos como xenobióticos y toxinas. Entonces, al ser el órgano responsable de los procesos de detoxificación, la glándula digestiva está sujeta a altos niveles de estrés oxidativo, que podría generar daño a moléculas esenciales como al ADN, proteínas, lípidos etc. Como se mencionó anteriormente, un incremento en el nivel de transcripción de los genes involucrados en la regulación de ciclo celular (*p21*, *p53*, *cafp55*) es indicativo de la activación de mecanismos de replicación y reparación del ADN dañado a nivel celular.

Los cambios en la forma de la célula pueden conducir a alteraciones en la estructura del citoesqueleto (Runnegar y Falconer, 1986). Por lo tanto, las modificaciones observadas en los tejidos (principalmente de los túbulos de la glándula digestiva, intestino, branquia y manto) inducidas por la exposición al dinoflagelado ocasionaron alteraciones en la organización de citoesqueleto, y muy probablemente en la redistribución de los filamentos de actina, microtúbulos y otras proteínas asociadas a actina, generando así modificaciones

en los niveles de transcripción de los genes que las codifican. Por tanto, el mecanismo tóxico de PST en las células de los ostiones podría ser similar al reportado por otras neurotoxinas como las micotoxinas en peces, moluscos y células de mamífero (Levefre et al., 2009).

### **8.5 Efecto de *G. catenatum* en la expresión de genes de respuesta inmune en hemocitos de *C. gigas* de 50 ± 10 mm**

Los hemocitos pueden estar implicados en una amplia variedad de procesos fisiológicos, como pueden ser los mecanismos de digestión o de excreción (Haberkorn et al., 2010a, Mello et al., 2012), de transporte y procesos de reparación de la concha en moluscos (Scotti et al., 2007; Haberkorn et al., 2010a). Sin embargo, la función principal de estas células es la defensa contra agentes patógenos (Bayne et al., 1980) al intervenir en una serie de reacciones inmunes esenciales para la supervivencia de bivalvos en el ambiente (Mello et al., 2012). El impacto en el sistema inmune de bivalvos a especies de algas nocivas y sus ficotoxinas asociadas es actualmente objeto de debate y, en la actualidad, existen pocos estudios.

Los hemocitos pueden tener múltiples oportunidades de estar en el contacto directo con las toxinas durante los eventos de FAN. En primer lugar, en la cavidad paleal donde hemocitos se encuentran protegiendo al hospedero de patógenos potenciales, incluso antes de la invasión (Allam et al., 1998). En segundo lugar, después de la alimentación por filtración y la digestión de las algas dañinas, cuando las toxinas intracelulares son liberadas y terminan

en los tejidos animales y en el sistema vascular semi-abierto donde los hemocitos son abundantes (Ford et al., 2008). Ford et al. (2008) plantean que los hemocitos pueden migrar a través del epitelio intestinal, fagocitando las algas parcialmente digeridas y posteriormente regresar a la circulación en la hemolinfa. Por otra parte, Franchini et al. (2003) demostraron a través de inmunolocalización una gran cantidad de yesotoxinas en el citoplasma de hemocitos de mejillones. En este trabajo, los genes de respuesta inmune estudiados en hemocitos de *C. gigas* (*lgbp*, *cvt* e *ifi44*) resultaron altamente regulados en los ostiones expuestos a *G. catenatum* principalmente a las 24 horas de exposición en dietas mixtas y en la dieta con solo el dinoflagelado (control tóxico).

Como se mencionó anteriormente, el LGBP juega un papel crítico en las interacciones parásito-huésped. En juveniles de  $50 \pm 10$  mm el mayor nivel de expresión del gen *lgbp* se encontró al comienzo del experimento en los ostiones alimentados con el control tóxico, y fue disminuyendo con el transcurso del bioensayo. Sin embargo, en los organismos alimentados con la dieta mixta *I. galbana* + *G. catenatum*  $6 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>, el nivel de expresión alcanzó su máximo nivel al final del bioensayo (día 7). Por lo tanto, estas observaciones corroboran la activación de la respuesta inmune inmediata para proteger a los ostiones alimentados con sólo *G. catenatum* al modular inmediatamente dicho gen.

También se analizó la expresión del gen *cvt* que codifica una proteína llamada Pernina o cavortina; esta proteína fue descubierta por primera vez en el mejillón *Perna viridis* (Scotti et al., 2007). La carvotina (CVT) es una proteína no pigmentada, glicosilada con actividad de inhibición de serin-proteasas, que se asocia con hierro lo que indica que puede funcionar como agente quelante del hierro. La CVT es una proteína común en la hemolinfa y está

constituida por un sólo dominio derivado de la superóxido dismutasa SODC, también se ha encontrado en moluscos bivalvos del género *Crassostrea* (Scotti et al., 2001). Esta proteína tiene varias funciones: 1) como una proteína de defensa en ostiones expuestos a microorganismos patógenos y químicos peligrosos; 2) como hemaglutinina, si bien no aglutina bacterias, incrementa la fagocitosis de partículas extrañas; y 3) como lactoferrina, al secuestrar hierro puede efectuar una acción antibacterial. Con base a lo anterior, la CVT puede tener un papel muy importante en la sobrevivencia y el mecanismo de defensa en *C. gigas*.

Algunos estudios han demostrado sobreexpresión del gen de la cavortina (*cvt*) en juveniles seleccionados de *C. gigas* por resistencia a la mortalidad de verano (Huvet et al., 2004). Tanguy et al, 2004 también observaron expresión diferencial de *ctv* en *C. virginica*, donde encontraron un aumento de tres veces la expresión del ARNm de *cvt* después de 45 días de exposición a la infección con el protozoario *P. marinus*; demostrando así el papel importante que juega este gen en la defensa de los organismo. En un estudio más reciente, se reportó la sobreexpresión de la proteína CVT en juveniles de *C. gigas* expuestos a extractos de dinoflagelados del genero *Prorocentrum* (Matus, 2013). Sin embargo, el presente trabajo, es el primer reporte de la modulación (sobreexpresión) de *ctv* en *C. gigas* como respuesta a la exposición a *G. catenatum* productor de toxinas paralizantes.

El *if44* es un gen inducible específico de interferón, está implicado en defensa antiviral; fue reportado por primera vez en el hígado de chimpancés infectados con el virus de la hepatitis C (Kitamura et al., 1994). Este gen también muestra actividad antiproliferativa, posiblemente contribuyendo a la detención del ciclo celular ya que provoca una

disminución de GTP celular y suprime la señalización de cinasas reguladas por una señal extracelular (Hallen et al., 2007). Green et al. (2009), reportaron un gen homólogo en el ostión de roca *Saccostrea glomerata*, este gen fue significativamente sobre expresado en organismos con neoplasia. Por otro lado, Renault et al. (2011), reportaron la sobreexpresión de *if44* en hemocitos de juveniles de *C. gigas* 24 y 48 horas después de una exposición a herpes virus (OSHV-1). En el presente trabajo, el nivel de expresión del gen *if44* también fue altamente modulada en hemocitos de *C. gigas* como respuesta a la presencia de *G. catenatum*. La sobreexpresión fue mayor durante el primer día de exposición en los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I galbana* + *G. catenatum* ( $6 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) (9 veces arriba del nivel basal) y con el control tóxico ( $6 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) 16 veces arriba del nivel basal). Estos resultados corroboran que este gen, efectivamente, está implicado en la primera fase de respuesta inmune innata y (que al igual que con los genes previamente mencionados) el ostión reconoce a la célula del dinoflagelado o las toxinas PST una vez liberadas en el tracto digestivo como agentes dañinos que deben ser neutralizados.

El gen *hsp70* también se sobreexpresó principalmente en el primer día de exposición al dinoflagelado tanto en la dieta mixta de *I galbana* + *G. catenatum* ( $6 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) como en el control tóxico solo *G. catenatum* ( $6 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>). Las HSP (Heat Shock Proteins) han sido ampliamente estudiadas y se conocen como proteínas de choque térmico. Sin embargo, se ha demostrado que la expresión de estas proteínas también puede inducirse por otros estímulos como la carencia de oxígeno, la presencia de metales pesados, agentes físicos y químicos, o cualquier factor que produzca un estrés celular (Santoro, 2000; Fabbri, 2008). A pesar de que la expresión de estas proteínas puede ser modulada por el estrés, en condiciones normales su principal función está asociada a procesos de plegamiento

proteico, donde actúan como *chaperonas* ayudando a la adquisición de una estructura tridimensional de las proteínas biológicamente activa, teniendo un papel fundamental en procesos de desarrollo y de diferenciación celular (Feder y Hofmann, 1999; Fabbri et al. 2009; Tomanek, 2011).

La implicación de estas proteínas en procesos de estrés se ha descrito en algunas especies de organismos acuáticos (Sanders, 1993; Snyder et al., 2001). Aunque de forma tradicional se ha utilizado la expresión de las HSP como marcador en procesos de estrés y contaminación (Sanders y Martin, 1993; Sanders et al., 1994; Feder y Hofmann, 1999; Cruz-Rodríguez et al., 2000; Porte et al., 2001), su modulación también se ha relacionado con procesos inmunes, ya que su expresión se ha visto incrementada tras la estimulación de los hemocitos con *Vibrio anguillarum* (Song et al., 2006; Gestal et al., 2007; Cellura et al., 2007). Además, se han encontrado varias ESTs con homología a HSP en varias librerías construidas tras una estimulación bacteriana o parasitaria (Tanguy et al., 2004; Kang et al., 2006; Gestal et al., 2007), refrendando la hipótesis de su posible papel en los mecanismos de defensa. En otro estudio se ha demostrado que *V. anguillarum* es capaz de aumentar la síntesis de la *hsp70* en el mejillón del Mediterráneo, teniendo su punto más alto de expresión a las 48 horas después de su inoculación (Cellura et al., 2007). Otros estudios reportaron aumento en los niveles de transcripción de *hsp70* en hemocitos de *C. gigas* expuestos durante 4 h a extractos de brevetoxinas (Mello et al., 2012) y a células completas de un dinoflagelado productor de PST *A. minimum* y a la saxitoxina pura (Mello et al., 2013).



Los estudios anteriores, junto con el resultado obtenido en el presente trabajo, apoyan el papel de *hsp70* como proteína de respuesta general al estrés. La regulación al incremento de la *hsp70* de forma recurrente podría estar asociada a aumentos en la resistencia de los animales a factores de estrés, incluyendo compuestos tóxicos (Song et al., 2006). Por otro lado, es importante destacar que el genoma secuenciado de *C. gigas*, reveló que el ostión del Pacífico contiene 88 genes de *hsp70*, mucho más que los 17 genes descritos en humanos (Zhang et al., 2012). En asociación a nuestros resultados, este número elevado de chaperonas refuerza la importancia de las HSP70 en el ostión, en respuesta al estrés generado por la adaptación al medio marino. Además, la modulación del gen *hsp70* en hemocitos de *C. gigas* expuestos a *G. catenatum* probablemente también esté relacionada a procesos inmunes, por lo tanto, es importante analizar otros genes relacionados a las *hsp70*, para entender más a detalle esta respuesta.

### **8.6 Daños histológicos en *C. gigas* de $3 \pm 1$ mm y $50 \pm 10$ mm por efecto de *G.***

#### ***catenatum***

Las lesiones y los cambios estructurales del epitelio gastrointestinal son indicadores importantes de la salud en moluscos bivalvos (Elston, 1999). Las alteraciones estructurales se presentan con mayor frecuencia en la glándula digestiva y se componen de aplanamiento celular, inflamación, ruptura, exfoliación y metaplasia (Wikfors y Smolowitz, 1993). Algunos de estos cambios pueden ser reversibles, cuando se deben a cambios temporales en el medio ambiente, pero otras manifestaciones patológicas como la exfoliación epitelial, cuando es grave y que conlleva pérdida de células epiteliales, puede ser irreversible siendo

una condición terminal (Elston, 1999). Probablemente esta condición sucede en los ostiones alimentados con la dieta mixta *I. galbana* + *G. catenatum*  $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>, debido a que los epitelios mostraron una grave exfoliación epitelial, aunado a que con dicho tratamiento también se observó el mayor incremento en la expresión de la mayoría de los genes analizados, para tratar de reestablecer la homeostasis celular.

Elson (1999) ha reportado que la pérdida de la altura normal de las células de los túbulos de la glándula digestiva y el aplanamiento del epitelio puede ocurrir durante los períodos de abundante fitoplancton. Estas observaciones sugieren que los elementos tóxicos de ciertas especies de fioplancton, o de otras fuentes, pueden resultar en la reducción de la alimentación o un efecto tóxico directo. La altura del epitelio de las células de absorción puede ser categorizada como alta (normal), media y baja. Una altura elevada del epitelio representa una condición normal y un proceso de digestión del metabolismo de absorción activo; la altura media indica una condición de reducción en la alimentación y, por lo tanto, del metabolismo; y finalmente la altura baja de las células del epitelio se considera una condición patológica. En todo caso, la altura baja de las células de la glándula digestiva indica una reducción considerable en la alimentación que podría resultar en la disminución del crecimiento en condiciones de cultivo (Elson, 1999). La disminución en la altura del epitelio de los túbulos digestivos podría explicar la disminución significativa en la tasa de aclaramiento observada en los ostiones alimentados con la dieta mixta con  $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> de *G. catenatum*.

Por otro lado, los ostiones juveniles pueden ser afectados por la exfoliación aguda del epitelio digestivo. En algunos casos, las células epiteliales individuales de los órganos del

tracto digestivo, más comúnmente las células de absorción de las glándulas digestivas, se desprenden de las células vecinas y cubren el lumen de la glándula. El proceso es progresivo y, en casos avanzados, casi todo el epitelio de la glándula digestiva se exfolia y se funde en el lumen de órganos. La afección a menudo es fatal debido a la gran pérdida de epitelio del tracto digestivo (Elson, 1999; Goslin, 2003). Como resultado, el lumen del órgano contiene restos celulares, principalmente gránulos y vacuolas de las células de absorción. Posteriormente, la secreción y células indiferenciadas restante, se extienden para cubrir los espacios dejados por las células de absorción exfoliadas, impartiendo así un aspecto metaplásico anormal en el órgano. El resultado de esta condición no se conoce, pero se cree que la recuperación es posible, se ajusta a la definición de metaplasia, la cual es un cambio reversible en la que un tipo de célula adulta reemplaza a otro tipo de célula adulta (Elson, 1999; Goslin, 2003). Las exotoxinas de algas o traumatismos mecánicos causados por las células de algas podrían ser una la base etiológica de estas condiciones. Pearce et al. (2005), reportaron el aplanamiento y la disminución de la altura de las células del epitelio, así como un alto grado de exfoliación epitelial, en *C. gigas* expuesto al dinoflagelado *P. rhathymum*.

En el presente trabajo, la inflamación de los tejidos observado en el grupo experimental (expuesto a *G. catenatum*) se caracterizó por una alta migración de hemocitos hacia dentro de los epitelios de diferentes órganos (diapédesis), desintegración de epitelios, necrosis y presencia de células anormales. Algunos autores sugieren que la diapédesis de hemocitos a través de los epitelios del tracto digestivo ocurre con el fin de eliminar las toxinas y así proteger los tejidos de la toxicidad, como una respuesta neutralizante a los daños por dichos

compuestos, es decir como una vía de desintoxicación (Hégaret et al., 2008 a,b, 2009; Haberkorn et al., 2010).

Además, las alteraciones del músculo estriado (posible atrofia), fueron mayores en los ostiones alimentados con la dieta mixta de  $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> y el control tóxico. En cambio en los ostiones de  $50 \pm 10$  mm, no se observaron cambios visibles en el tejido muscular como los encontrados en los ostiones más pequeños, cabe mencionar que posiblemente el tiempo que duro el bioensayo en los ostiones de mayor talla, no fue suficiente para ocasionar daños. Sin embargo, si se observaron cambios similares en la glándula digestiva, intestino, branquia entre los ostiones de ambas tallas.

Las modificaciones de la estructura y actividad muscular han sido previamente reportados en bivalvos expuestos a dinoflagelados productores de PST. En un estudio realizado por Hégaret et al. (2007), encontraron que el musculo aductor de *C. virginica* sufrió parálisis al exponer a los organismos al dinoflagelado *A.fundyense*. Recientemente, Tran et al. (2010) reportaron cambios de comportamiento en *C. gigas* expuesto a *A. minutum* como aumento de duración de la apertura de la valva, producción de pseudoheces, disminución en la tasa de filtración y cierre anormal de las valvas, este último cambio fue relacionado con la disfunción del músculo aductor. Hégaret et al. (2009) observaron que los músculos aductores de *Ruditapes philippinarum* fueron alterados después de la exposición a *P. minimum*. Por otro lado, el músculo aductor de ostiones expuestos a *A. minutum* fueron intensamente afectados presentando amiotrofia, degeneración hialina y alteración del patrón ondulado de las fibras musculares (Haberkorn et al., 2010). Dichos cambios de la estructura del tejido muscular pueden estar asociados con la parálisis muscular observada durante la

exposición a *Alexandrium* en *C. virginica* (Hégaret et al. 2007b) y en *Mytilus edulis* (Galimany et al., 2008). Por lo tanto, modificaciones de la estructura y la actividad muscular pueden afectar posiblemente la respiración y los procesos de nutrición llevando así al deterioro de la salud de los organismos (Frank et al., 2007; Hégaret et al., 2012).

Los daños observados en las branquias como desorganización del epitelio e infiltración de hemocitos a nivel del tejido conjuntivo, además de alteración de los filamentos branquiales, fusión y pérdida de la ciliatura; pueden explicarse considerando que las branquias son el primer órgano de contacto directo con las células tóxicas durante los procesos de filtración. El mayor grado de alteración en los ostiones expuestos a *G. catenatum* fue en la dieta mixta de  $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> y el control tóxico. Haberkorn et al. (2010) mostraron que las branquias se vieron afectados por la exposición *A. minutum*, encontrando un aumento significativo en la producción de moco en ostiones expuestos a *A. minutum*.

## 9. CONCLUSIONES

- La comparación de los ostiones expuestos a dietas mixtas con *G. catenatum* y los expuestos al control no tóxico (dieta con *I. galbana*) nos permitieron confirmar, que los ostiones se alimentan activamente y tiene la capacidad de ingerir las dos microalgas.
- *C. gigas* en todos los casos (dietas mixtas y control tóxico en juveniles de  $3 \pm 1$  mm y  $50 \pm 10$  mm) mostró cambios visibles en su comportamiento alimenticio cuando estuvo en contacto con las células tóxicas: cierre inmediato de valvas, producción de pseudoheces y moco, retracción del manto y disminución de la tasa de aclaramiento.
- Los cambios a nivel transcripcional en los genes monitoreados fueron tiempo- y concentración-dependiente.
- La exposición de *C. gigas* a las células tóxicas de *G. catenatum* provocó un aumento en el nivel de transcripción de genes que codifican proteínas implicadas en respuesta a estrés, antioxidante, detoxificación e inmune (respuesta aguda), con un incremento mayor a mediano plazo (respuesta subcrónica).
- El incremento en el nivel de expresión del gen *cyp356A1* en fase subcrónica, indica su posible participación en los procesos de eliminación de las toxinas PST en juveniles de *C. gigas* de  $3 \pm 1$  mm.
- Se observó una alta modulación de la transcripción en genes involucrados en la regulación del ciclo celular, reparación del ADN dañado y la muerte celular programada como: *p21*, *cafP55*, *p53*, *ef2*, *casp1* principalmente bajo exposición

subcrónica; esto podría implicar que el dinoflagelado o sus toxinas tienen algún tipo de efecto genotóxico.

- La identificación y selección de los genes de referencia es un paso crucial para llevar a cabo los análisis de expresión génica a nivel transcripcional: 1) los genes más estables en los ostiones de talla pequeña fueron: *gapdh* y *28s ARNr*; 2) los genes más estables en análisis tejido-específico fueron: *gapdh*, *ef-1 $\alpha$*  y *tub  $\beta$*  para glándula digestiva y *gapdh*, *ef-1 $\alpha$*  y *28s ARNr* en hemocitos.
- En la glándula digestiva de los ostiones de  $50 \pm 10$  mm se identificó una marcada desregulación en el nivel transcripcional de *p21*, *p53*, *caf p55* y *ef2*, principalmente en los organismos alimentados sólo con *G. catenatum* (control tóxico).
- El incremento en la expresión de *casp1* indica que un daño tisular está en curso, desencadenando procesos inflamatorios en los organismos expuestos a *G. catenatum*.
- La modificación de la tasa de transcripción de *act* en la glándula digestiva hace evidente una desregulación severa y por lo tanto, desestabilidad en el citoesqueleto que puede conducir a una pérdida de la integridad celular.
- En hemocitos, la marcada modulación de los genes de respuesta inmune: *cvt*, *lgbp*, *if 44* y *hsp70* indica que *G. catenatum* es reconocido como un agente extraño, que promueve la activación de una respuesta de defensa inmediata en *C. gigas*.
- Los análisis histológicos realizados en los ostiones expuestos a *G. catenatum* mostraron un daño importante en los tejidos, principalmente en la glándula digestiva (aplanamiento celular, inflamación, ruptura, exfoliación, y metaplasia), intestino (diapédesis de hemocitos), branquia (alteración de los filamentos branquiales, fusión y pérdida de la ciliatura) músculo (edema, pérdida de masa muscular); el

daño observado mostro una relacion directa con la dosis del dinoflagelado y si este fue proporcionado en dieta simple o mixta.

- Se confirma la hipótesis planteada al encontrar que los patrones de expresión génica fueron diferenciales dependiendo del tipo de exposición aguda o subcrónica de *C. gigas* al estar expuesto a las células tóxicas durante las primeras horas, activa la primera línea de defensa al estrés mediada por la expresión de glutamina sintetasa (gs), proteína de shock térmico (hsp70), superóxido dismutasa (sod-cu/zn), glutatión s transferasa (gst-s) y del sistema inmune. En una etapa tardía, la mayor respuesta se encontró en los genes involucrados en la regulación del ciclo celular, citoesqueleto, inflamación, detoxificación (*cyp356A1*).
- El presente trabajo contribuye a entender un poco los mecanismos moleculares principalmente, los genes que son modificados en su nivel de expresión, ante las condiciones probadas. Sin embargo, sería importante realizar estudios más detallados que involucren otras técnicas como microarreglos o secuenciación masiva, para buscar genes que puedan utilizarse como marcadores específicos para evaluar el daño a la exposición al dinoflagelado tóxico.
- Se observó que si el ostión del Pacífico es expuesto a células solas de *G. catenatum*, el cambio en el nivel de expresión de los genes estudiados fue mayor en comparación con las dietas mixtas. Sin embargo, en condiciones naturales, cuando se presentan eventos FAN, estos no son unialgales. Por tanto, este tipo de dietas, así como la exposición a los extractos puros de las toxinas, no serían una respuesta comparable con lo que sucede en el ambiente cuando aparecen dichos eventos.
- Los ostiones juveniles de talla pequeña fueron los más afectados a la exposición del dinoflagelado tóxico, aunque no se utilizaron las mismas concentraciones del



dinoflagelado en las 2 tallas, se pudo observar que con concentraciones de  $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> de *G. catenatum* a los 7 días de exposición, se encontró una mayor modulación en todos los genes, comparados con los juveniles de mayor talla con una densidad mayor ( $6 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>).

## 10. REFERENCIAS

- Allam, B. y C. Paillard. 1998. Defense factors in clam extrapallial fluids. *Dis. Aquat. Org.* 33: 123–128.
- Almond, J.B. y M. Cohen. 2002. The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia* 16 (4): 433–43.
- Andersen, C.L., J.L. Jensen y F.T. Orntoft. 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer research* 64: 5245-5250.
- Aune, T. 2001. Risk assessment of toxins associated with DSP, PSP and ASP in seafood. *In* De Koe, W.J., Samson, R.A., Van Egmond, H.P., Gilbert, J. & M. Sabino, eds. *Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millennium. Proceedings of the X International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins* (May 2000, Guarujá, Brazil), pp. 515-526. Wageningen, the Netherlands, Ponsen & Looyen.
- Band-Schmidt C., J.J. Bustillo-Guzmán, I. Gárate-Lizárraga, C.H. Lechuga-Devéze, K. Reinhart, B. Luckas. 2005. Paralytic shellfish toxin profile in strains of dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham and the Scallop *Argopecten ventricosus* G-B. Sowerby II from Bahía Concepción. Gulf of California. México *Harmful Algae*. 4: 21-31.
- Band-Schmidt, C.J., J.J. Bustillos-Guzmán, J.D. López-Cortés, I. Gárate-Lizárraga, J.E. Núñez-Vázquez. 2010. Ecological and physiological studies of *Gymnodinium catenatum* in the Mexican Pacific: a review. *Marine drugs* 8: 1935–1961.
- Bardouil, M., M. Bohec, M. Cormerais, S. Bougrier, P. Lassus. 1993. Experimental study of the effects of a toxic microalgal diet on feeding of the oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *J Shellfish Res.* 12: 417–422.
- Bardouil, M., M. Bohec, M. Cormerais, S. Bougrier, P. Lassus. 1996. Experimental study of the effects of a toxic microalgal diet on feeding of the oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *J. Shellfish Res.* 12: 417–422.
- Bao, Y.B., L. Li L, X.M. Ye, H.Y. Dong, X.W. Jin, H.Z. Lin. 2013. Expression of glutamine synthetase in *Tegillarca granosa* (Bivalvia, Arcidae) hemocytes stimulated by *Vibrio parahaemolyticus* and Lipopolysaccharides. *Genetics and Molecular Research* 12 (2): 1143-1154
- Bayne, J.C., P.M. Buckley, P.C. DeWan. 1980. *Schistosoma mansoni*: Cytotoxicity of hemocytes from susceptible snail hosts for sporocysts in plasma from resistant *Biomphalaria glabrata*. *Exp Parasitol.* 50 (3): 409-416

- Blanco J., I.M. Reyero, M.J. Franco I.M. Reyero, A. Moroño. 1997. PSP detoxification kinetics in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. One- and two-compartment models and the effect of some environmental variables. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 158: 165-175.
- Blanco J., I.M. Reyero, M.J. Franco. 2003. Kinetics of accumulation and transformation of paralytic shellfish toxins in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon* 42: 777-784.
- Böttger, S., E. Jerszyk, B. Low, C. Walker. 2008. Genotoxic stress-induced expression of p53 and apoptosis in leukemic clam hemocytes with cytoplasmically sequestered p53. *Cancer Research* 68: 777-82.
- Bougrier, S., A.J.S. Hawkins, Héral M. 1997. Preingestive selection of different microalgal mixtures in *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis*, analysed by flow cytometry. *Aquaculture*. 150 (1-2): 123-124.
- Bougrier, S. 2003. Paralytic shellfish poison accumulation yields and feeding time activity in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and king scallop (*Pecten maximus*). *Aquatic Living Resources*, 16(4): 347-352.
- Boutet, I., A. Tanguy, M. Auffret, N. Mujdzic, D. Moraga. 2003b. Expresión of Hsp 70 in experimentally metal exposed European flat oyster *Ostrea edulis*. 22(3): 763-766.
- Boutet I, A. Tanguy, D. Moraga. 2004. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene* 329: 147-157.
- Bricelj, V.M. y S.E. Shumway. 1998. Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics and biotransformation. *Rev. Fish. Sci.* 6: 315-383.
- Bricelj, V.M., L. Connell L, K. Konoki, P.S. Macquarrie, T. Scheuer, A.W. Catterall, L.V. Trainer. 2005. Sodium channel mutation leading to saxitoxin resistance in clams increase risk of PSP. *Nature* 434: 763-767.
- Buggr, D. M., H. Hegaret, G. H. Wikfors, B. Allam. 2007. Oxidative burst in hard clam (*Mercenaria mercenaria*) hemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 23: 188-196.
- Burgess, V. y G. Shaw. 2001. Pectenotoxins – an issue for public health. A review of their comparative toxicology and metabolism. *Environment International* 27: 275-283.
- Bustin S.A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR. (RT-PCR) trends and problems. *J. Mol. Endocrinol*, 29:23-39.
- Carsten C y M.P. Mattson. 2005. p53 inneuronal apoptosis. *Biochem and Biophys Res Commun.* 331 (3): 761-777.

- Cáceres-Martínez, J. y R. Vásquez-Yeomans. 2013. Enfermedades, parásitos y episodios de mortalidad de ostiones de importancia comercial en México y sus implicaciones para la producción. *Ciencia Pesquera*. 21: 5-48
- Cellura, C., M. Toubiana, N. Parrinello, P. Roch. 2007. Specific expression of antimicrobial peptide and HSP70 genes in response to heat-shock and several bacterial challenges in mussels. *Fish Shellfish Immunol*. 22 (4): 340–350.
- Collin H, A.L. Meistertzheim, D. Moraga, I. Boutet. 2010. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793), to pesticide exposure under experimental conditions. *J Exp Biol* 213: 4010–4017.
- Cortés-Altamirano, R. 1998b. *Las mareas Rojas*. AGT, Editor, S.A. México, D.F.: 161 pp.
- Coughlan J. 1969. The estimation of filtering rate from the clearance of suspensions. *Marine Biology*. 2: 356-358.
- Chao, C., S. Saito, J. Kang, W.C. Anderson, E. Appella Y. Xu. 2000. p53 transcriptional activity is essential for p53-dependent apoptosis following DNA damage. *The EMBO J*. 19 (18): 4967-4975.
- Choi, M. C., H.P.D. Hsieh, S.K.P. Lam, W.X. Wang. 2003. Field depuration and biotransformation of paralytic shellfish toxins in scallop *Chlamys nobilis* and green-lipped mussel *Perna viridis*. *Marine Biology*, 143(5): 927-934.
- Denslow N., N. Garcia-Reyero, y D.S. Barberc. 2007. Fish 'n' chips: the use of microarrays for aquatic toxicology. 3(3): 172–177.
- Estrada, N., M.D. Jesús, A. Campa-córdova, A. Luna. 2007. Effects of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* on hydrolytic and antioxidant enzymes, in tissues of the giant lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 146: 502–510.
- Fabbri E., P. Valbonesi P., S. Franzellitti. 2008. HSP expression in bivalves. *ISJ* 5: 135-161.
- FAO, 2005. Estudio de alimentación y nutrición sobre Biotoxinas Marinas: intoxicación paralítica por mariscos (PSP) FAO, Fisheries Information, Data and Statistics Unit. Rome. 5-49 pp.
- FAO. 2006. Cultured Aquatic Species Information Programme – *Crassostrea gigas*. Text by Helm, M. M. FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome.
- Farcy, E., C. Fleury, C. Lelong, P.M. Dubos, C. Voiseux, B. Fievet, M.J. Lebel. 2008b. Molecular cloning of a new member of the p53 family from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and seasonal pattern of its transcriptional expression level. *Marine Environmental Research* 66: 300–308.

- Feder, M.E. y G.E. Hofmann 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61: 243–282.
- Fernández-Reiriz, M.J., M.J. Navarro, A.M. Contreras, U. Labarta. 2008. Trophic interactions between the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* and *Mytilus chilensis*: feeding and digestive behaviour to long-term exposure. *Aquatic Toxicology*. 87: 245–251.
- Ford, S.E., M.V. Bricelj, C. Lambert, C. Paillard. 2008. Deleterious effects of a nonPST bioactive compound(s) from *Alexandrium tamarense* on bivalve hemocytes. *Mar. Biol.* 154: 241–253.
- Franchini, A., A. Milandri, R. Poletti, E. Ottaviani. 2003. Immunolocalization of yessotoxins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon*. 41 (8): 967-970.
- Gainey, L.F. y S.E. Shumway. 1988. A compendium of the responses of bivalve mollusks to toxic dinoflagellates. *Journal of Shellfish Research* 7: 623–628.
- Galimany, E., I. Sunila, I. Hegaret, G. Wikfors, M. Ramon. 2008. Pathology and immune response of the blue mussel (*Mytilus edulis L.*) after an exposure to the harmful dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Harmful Algae* 7: 630–638.
- Gestal, C., M.M. Costa, B. Novoa, A. Figueras. 2007 Analysis of differentially expressed genes in response to bacterial stimulation in hemocytes of the carpet –shell clam *Ruditapes decussatus*: identification of new antimicrobial peptides. *Gene*. 406 (1-2): 134-143.
- Gifford DJ, A.D. Caron. 2000. Sampling, preservation, enumeration and biomass of marine protozooplankton. In: Harris RP et al. (Eds) ICES Zooplankton methodology manual. Academic Press, London. pp. 193-221.
- Girón-Pérez MI. 2010. Relationships between innate immunity in bivalve mollusks and environmental pollution. *ISJ* 7: 149–156.
- González-Romero, R., C. Rivera-Casas, J. Fernández-Tajes, J. Ausió, J. Méndez, M.J. Eirín-López. 2012. Chromatin specialization in bivalve molluscs: A leap forward for the evaluation of okadaic acid genotoxicity in the marine environment. *Comparative Biochem. and Phys. part C* 155: 175–181.
- Gosling E. 2003. *Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture*. Wiley-Blackwell. 456 p.
- Green, T. J., J.T. Dixon, E. Devic, A.D. Adlard, C.A. Barnes. 2009. Differential expression of genes encoding anti-oxidant enzymes in Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata* (Gould) selected for disease resistance. *Fish Shellfish Immunol.* 26: 799-810.

- Gruenheid, S. y B.B. Finlay. 2003. Microbial pathogenesis and cytoskeletal function. *Nature* 422 (6933): 775–781.
- Guillard, R.L.L. y H. Ryther. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In Smith, W.L. and M.M., Chalg, (Eds) *Culture of marine invertebrate animals*, Plenum Press, New York. pp. 29-60.
- Haberkorn H., C. Lambert., N. Le Goïca., M. Guéguen., M. Moal., E. Palacios., P. Lassus., P. Soudanta. 2010a. Effects of *Alexandrium minutum* exposure upon physiological and hematological variables of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*. *Aquatic Toxicology*. 97: 96–108.
- Haberkorn, H, C. Lambert, N.C. Le goi, J. Moal, M. Suquet, M. Guegen, I. Sunila, P. Soudat. 2010b. Effects of *Alexandrium minutum* exposure on nutrition-related processes and reproductive output in oysters *Crassostrea gigas*. *Harmful Algae*, 9: 427–439.
- Hallegraeff, G.M. 1995 Harmful algal blooms: a global overview, In: *Manual on Harmful Marine Microalgae* (ed. by G.M. Hallegraeff, D.M. Anderson & A.D. Cembella), pp. 1-22 IOC Manuals and Guides, UNESCO. 33.
- Hallen, L., Y. Burki, M. Ebeling, C. Broger, F. Siegrist, K. Oroszlan-Szovik, B. Bohrmann, U. Certa, and S. Foser. 2007. Antiproliferative activity of the human IFN- $\alpha$ -inducible protein IFI44. *J. of Interferon & Cytokine Res.* 27: 675-680.
- Hartl, U.F. 1996. Molecular chaperones in celular protein folding. *Nature*. 381: 571-580
- Hégaret, H. y G. Wikfors. 2005. Time-dependent changes in hemocytes of eastern oysters *Crassostrea virginica* and northern bay scallops *Argopecten irradians irradians*, exposed to a cultured strain of *Prorocentrum minimum*. *Harmful Algae* 4 (2): 187-199.
- Hégaret, H., G. Wikfors, P. Soudant, C. Lambert., J.B. Bérard. 2007a. Minimal apparent effect on oyster hemocytes, *Aquat. Living Resour.* 152: 441-447.
- Hégaret, H., G. Wikfors, S. Shumway. 2007. Diverse feeding responses of five species of bivalve mollusk when exposed to three species of harmful algae. *Journal of Shellfish Research* 26, 549-559.
- Hégaret, H., G. Wikfors, S. Shumway. 2009. Biotxin contamination and shellfish safety, In: *Shellfish Quality and Safety* (ed. by Shumway, S.E. & G.E. Rodrick). Woodhead Publishing Cambridge, pp. 43-80.
- Hégaret, H., K.B. Brokordt., C.F. Gaymer., K.B. Lohrmann., C. García., D. Varela. 2012. Effects of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* on histopathological and escape responses of the Northern scallop *Argopecten purpuratus*. *Harmful Algae* 18, 74–83.

- Helm, M.M., N. Bourne., A. Lovatelli. 2006. Hatchery culture of bivalves. A practical manual. FAO Fisheries Technical Paper, pp.177.
- Howard, D.W. y C.S. Smith. 1983. Histological techniques for marine bivalve mollusks. *National Oceanic and Atmospheric Administration*. Technical Memorandum NMFSF/ NEC-25. U.S. Department of Commerce, pp 95.
- Huvet A., A. Herpin., L. Degremont., Y. Labreuche., J.F. Samain., C. Cunningham. 2004. The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene*. 343, 211–220.
- Jenny M.J., A.H. Ringwood., E.R. Lacy., A.J. Lewitus., J.W. Kempton., P.S. Gross., G.W. Warr., R.W. Chapman. 2002. Potential indicators of stress response identified by expressed sequence tag analysis of hemocytes and embryos from the American Oyster, *Crassostrea virginica*. *Mar. Biotechnol.* 4: 81-93.
- Keppler, C.J. 2007. Effects of Ammonia on Cellular Biomarker Responses in Oysters *Crassostrea virginica*. *Ecological Engineering* 63-66.
- Kitamura, A., K. Takahashi., A. Okajima., N. Kitamura. 1994. Induction of the human gene for p44, a hepatitis C-associated microtubular aggregate protein, by interferon- $\alpha/\beta$ . *Eur. J. Biochem.* 224: 877-883.
- Kodama, M. 2010. Paralytic Shellfish Poisoning Toxins: Biochemistry and Origin. *ABSM* 3: 1–38.
- Laabir, M., Z. Amzil., P. Lassus., E. Masseret., Y. Tapilatu., R. Vargas., D. Grzebyk. 2007. Viability , growth and toxicity of *Alexandrium catenella* and *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) following ingestion and gut passage in the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquatic Living Resources* 57: 51–57.
- Lacoste A., F. Jalabert., S. Malham., A. Cueff., F. Gelebart., C. Cordevant., M. Lange., S.A. Poulay. 2001. A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortalities of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix. *Diseases of Aquatic Organisms* 46: 139-145.
- Landsberg, J.H. 2002. The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. *Reviews in Fisheries Science* 10: 113–390.
- Lassus P., M. Bardouil, P. Masselin, M. Naviner, P. Truquet. 2000. Comparative efficiencies of different non-toxic microalgal diets in detoxification of PSP-contaminated oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg). *J. Nat. Toxins* 9(1): 1-12.

- Lassus, P., R. Baron., P. Garen., P. Truquet., P. Masselin., M. Bardouil., D. Leguay., Z. Amzil. 2004. Paralytic shellfish poison outbreaks in the Penzé estuary: Environmental factors affecting toxin uptake in the oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquatic Living Resources* 214: 207–214.
- Lechuga-Devéze, C.H. y M.L. Morquecho-Escamilla. 1998. Early spring potentially harmful phytoplankton in Bahía Concepción, Gulf of California. *Bull. Mar. Sci.* 63(3): 503-512.
- Lefebvre, K.A., S.C. Tilton., T.K. Bammler., R.P. Beyer., S. Srinouanprachan., P.L. Stapleton. 2009. Gene Expression Profiles in Zebrafish Brain after Acute Exposure to Domoic Acid at Symptomatic and Asymptomatic Doses. *System.* 107(1): 65-77.
- Lesser, P.M. 2006. Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and Physiological Ecology. *Annual Review of Physiology* 68: 253–78.
- Llewellyn L.E., 2006. Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors. *Natural Products Reports* 23(2): 200-22.
- Lindhal, O. 1998. Occurrence and monitoring of harmful algae in the marine environment, 409 –423. En: Miraglia M., H. Van Egmond, C. Brera & J. Gilberts (Eds.). *Micotoxins and phycotoxins developments in chemistry, toxicology and food safety. Proceedings of the IX International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins*, pp. 409-423.
- Livak, K.J. y T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25 (4): 402–408.
- Manduzio, H., B. Rocher., F. Durand., C. Galap., F. Leboulenger. 2005. The point about oxidative stress in mollusks. *Review. ISJ* 2: 91-104.
- Martoja, R., M. Martoja-Pierson., P.P. Grassé., 1967. *Initiation aux techniques de l'histologie animale*. Paris, Masson. pp. 345.
- Mat, M.A., H. Haberkorn., P.J. Bourdineaud., J.C. Massabuau., D. Tran. 2013. Genetic and genotoxic impacts in the oyster *Crassostrea gigas* exposed to the harmful alga *Alexandrium minutum*. *Aquatic Toxicology* 458–465.
- Matus, M. 2013. Expresión diferencial de proteínas en juveniles de ostión japonés *Crassostrea gigas* expuestos a organismos del género *Prorocentrum* spp. Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. México.p106.
- Medeiros D.I., N.M. Siebert, G. Toledo-silva, O.M. Moraes, F.M.R. Marques, D.A.C. Bairy. 2008. Differential gene expression in oyster exposed to sewage. *Mar. Environmental. Research.* 66 (1): 156-157.



- Mirzayans, R., B. Andrais, A. Scott, D. Murray. 2012. New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: Implications for cancer therapy. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 1-16.
- Mons, M.N., H.P. Van Egmond, G.J.A. Speijers. 1998. Paralytic shellfish poisoning: A review. RIVM Report 388802 005. June 1998.
- Navarro, J.M., A.M. Contreras. 2010. An integrative response by *Mytillus chilensis* to the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Marine Biology* 157: 1967–1974.
- Núñez-Acuña, G., A.E. Aballay, H. Hégaret, P.A. Astuya, C. Gallardo-Escárate. 2013. Transcriptional responses of *Mytilus chilensis* exposed *in vivo* to saxitoxin (STX) *Journal of Molluscan Studies* 79 (4): 323-331.
- Ochoa, J.L., A. Sánchez-Paz., A. Cruz-Villacorta., E. Nunez-Vázquez., A. Sierra-Beltrán. 1997. Toxic events in the northwest Pacific coastline of Mexico during 1992-1995: origin and impact. *Hydrobiologia* 352: 195-200.
- Pérez-Linares J, J.L. Ochoa, A. Gago-Martínez. 2008. Effect of PSP toxins in white leg shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931. *JFS* 73: 69–73.
- Pérez-Linares J, J.L. Ochoa, A. Gago-Martínez. 2009. Retention and tissue damage of PSP and NSP toxins in shrimp: Is cultured shrimp a potential vector of toxins to human population. *Toxicon* 53: 185–195.
- Persson, A., B.C. Smith, G.H. Wikfors, M. Quilliam. 2006. Grazing on toxic *Alexandrium fundyense* resting cysts and vegetative cells by the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Harmful Algae* 5: 678–684.
- Pfaffl, M.W., A. Tichopad, C. Prgomet, T.P. Neuvians. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology letters* 26: 509-515.
- Renault T., N. Faury, V. Barbosa-Solomieu, K. Moreau. 2011. Suppression subtractive hybridisation (SSH) and real time PCR reveal differential gene expression in the Pacific cupped oyster, *Crassostrea gigas*, challenged with Ostreid herpesvirus. *Developmental & Comparative Immunology* 35 (7): 725-735.
- Romero-Geraldo R.J. y N.Y. Hernández-Saavedra. 2012. Stress gene expression in *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) in response to experimental exposure to the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge, 1975. *Aquac Res* 1–11.
- Saavedra, C. y E. Bachére. 2006. Bivalve Genomics. *Aquaculture*. 256: 1-14.
- Santoro M.G. 2000. Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochemical pharmacology* 59 (1): 55–63.

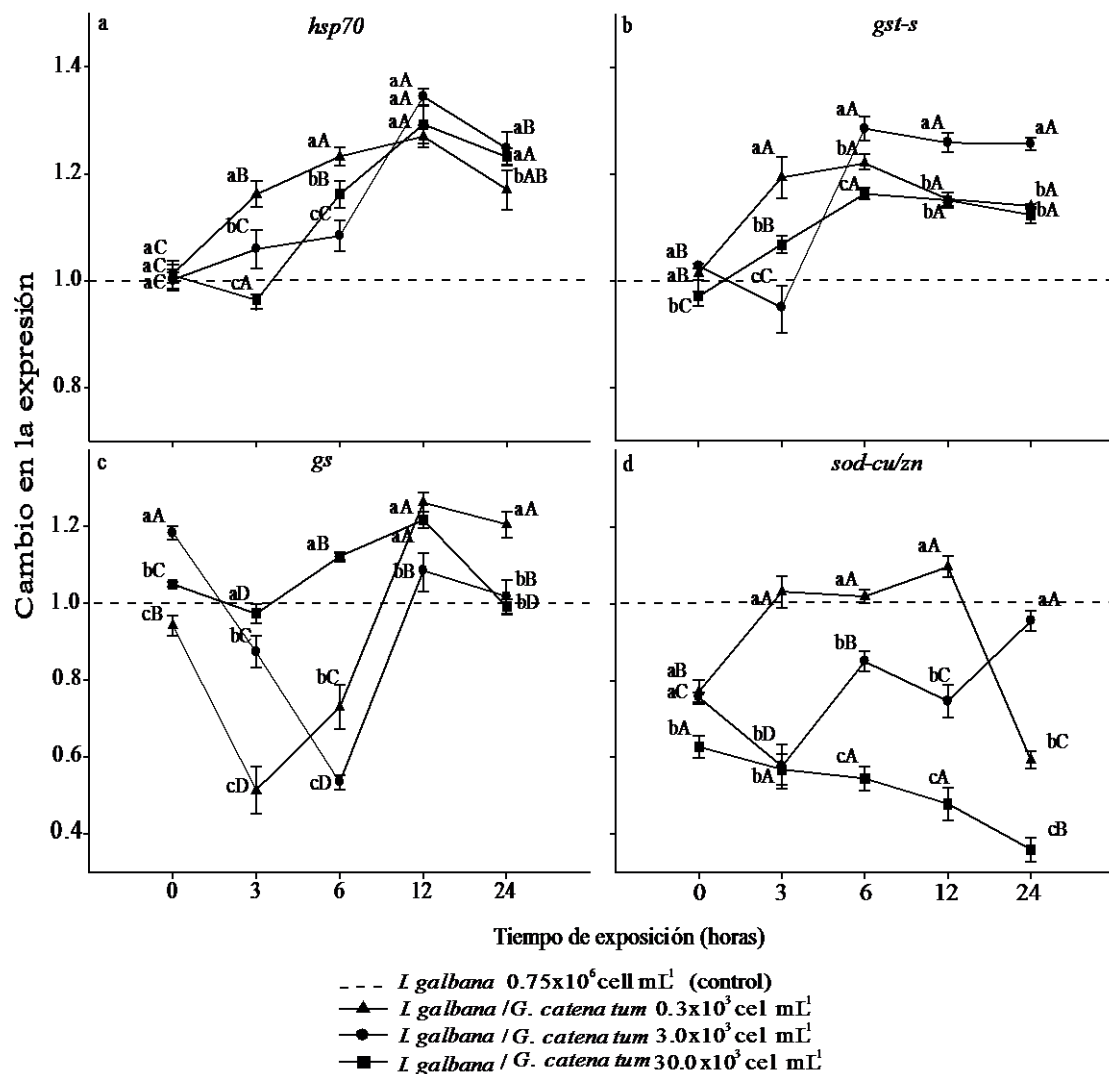
- Salierno, J.D., N.S. Snyder, A.Z. Murphy, M. Poli, S. Hall, D. Baden. 2006. Harmful algal bloom toxins alter c-Fos protein expression in the brain of killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Aquatic toxicology* 78(4): 350-357.
- Scotti D.P., C.D. Sally, D.R. Greenwood. 2007. Characterisation of cavortin, the major haemolymph protein of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) , New Zealand. *Journal of Marine and Freshwater Research* 41: 1 91-101
- Shumway, S.E. 1990. A review of the effects of algal blooms on shellfish and aquaculture. *Journal World Aquaculture Society* 2: 65–104.
- Shumway S.E. 1991. *Scallops: biology, ecology and aquaculture*. Elsevier Science Publishers B.V. New York, USA. 1095 pp.
- Sierra-Beltrán, A.P., A. Cruz-Villacorta, E. Núñez-Vázquez, L.M. Del Villar, J. Crerecero, J.L. Ochoa. 1998. An overview of the marine food poisoning in Mexico. *Toxicon* 35: 447-453.
- Siu-Chung L., W. Wen-Xiong, D. Hsieh\_2001. Feeding and absorption of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* by two marine bivalves from the South China Sea. *Marine Biology*. 139 (4): 617-624.
- Song, L., L. Wu, D. Ni, Y. Chang, W. Xu, K. Xing. 2006. The cDNA cloning and mRNA expression of heat shock protein 70 gene in the haemocytes of bay scallop (*Argopecten irradians*, Lamarck 1819) responding to bacteria challenge and naphthalin stress. *Fish Shellfish Immunol*. 21: 335–345.
- Sunila, I. y J. Labanca, 2003. Apoptosis in the pathogenesis of infectious diseases in the eastern oyster *Crassostreavirginica*. *Dis. Aquat. Org.* 56: 163-170.
- Snyder, R.V., P.D.L. Gibbs, A. Palacios, L. Abiy, R. Dickey, J.V. Lopez. 2003. Polyketide synthase genes from marine dinoflagellates. *Marine biotechnology* 5(1): 1-12.
- Vrolijk, N.H. y M.N. Targett .1992. Biotransformation enzymes in *Cyphomagibbsum* (Gastropoda: Ovilidae): implications for detoxification og gorgonian allelochemicals. *Mar Environ Res.* 88: 237-246.
- Tanguy, A., X. Guo., S.E. Ford. 2004. Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*C. gigas*) oysters. *Gene* 338: 121-131.
- Tanguy A., I. Boutet, D. Moraga. 2005. Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to pesticides exposure. *FEBS J.* 272: 390–403.
- Taylor-Harding, B., U.K. Binné, M. Korenjak, A. Brehm, N.J. Dyson. 2004. *Mol. Cell. Biol.* 24(20): 9124-36

- Toledo-Silva G., N.M. Siebert, D.I. Medeiros, T.C.M. Sincero, O.M. Moraes, J.V. Goldstone, D.A.C. Bainy. 2008. Cloning a new cytochrome P450 isoform (CYP356A1) from oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Environmental. Research.* 66 (1): 15\_18
- Tomanek, L. 2011. Environmental Proteomics: Changes in the Proteome of Marine Organisms in Response to Environmental Stress, Pollutants, Infection, Symbiosis, and Development. *Annual Review of Marine Science*, 3(1): 373-399.
- Tyler, J.K., M. Bulger, T.R. Kamakaka, R. Kobayashi. 1996. The p55 subunit of *Drosophila* chromatin assembly factor 1 is homologous to a histone deacetylase-associated protein. *Mol. Cell. Biol.* 16(11): 6149.
- Vandesompele, J., K. De Preter., F. Pattyn., B. Poppe., N. Van Roy. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3: 1–12.
- Vargas-Albores, F. y M.A. Barracco. 2001. Mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos, con énfasis en pectínidos. En: *Los moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura* (Maeda-Martínez, A. N., ed.) pp. 127-146. Editorial Limusa, México, D. F.
- Vasconcelos, V., J. Azevedo, M. Silva, V. Ramos. 2010. Effects of marine toxins on the reproduction and early stages development of aquatic organisms. *Marine Drugs.* 8: 59-79.
- Wikfors, G.H. 2005. A review and new analysis of trophic interactions between *Prorocentrum minimum* and clams, scallops and oysters. *Harmful Algae* 4: 585-592.
- Wildish, D., P. Lassus, J. Martin, A. Saulnier, M. Bardouil. 1998. Effect of the PSP causing dinoflagellate, *Alexandrium* spp. on the initial feeding response of *Crassostrea gigas*. *Aquatic Living Resources* 11: 35-43.
- Whalen EK, D. Morin D, C.Y. Lin, R.S. Tjeerdema, J.V. Goldstone. 2008. Proteomic identification, cDNA cloning and enzymatic activity of glutathione S-transferases from the generalist marine gastropod, *Cyphoma gibbosum*. *Arch Biochem Biophys* 478: 7–17.
- Zhang, G., X.Fang, X. Guo, L. Li, R. Luo, F. Xu, P. Yang. 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* 490: 49–54.

## 11. ANEXOS

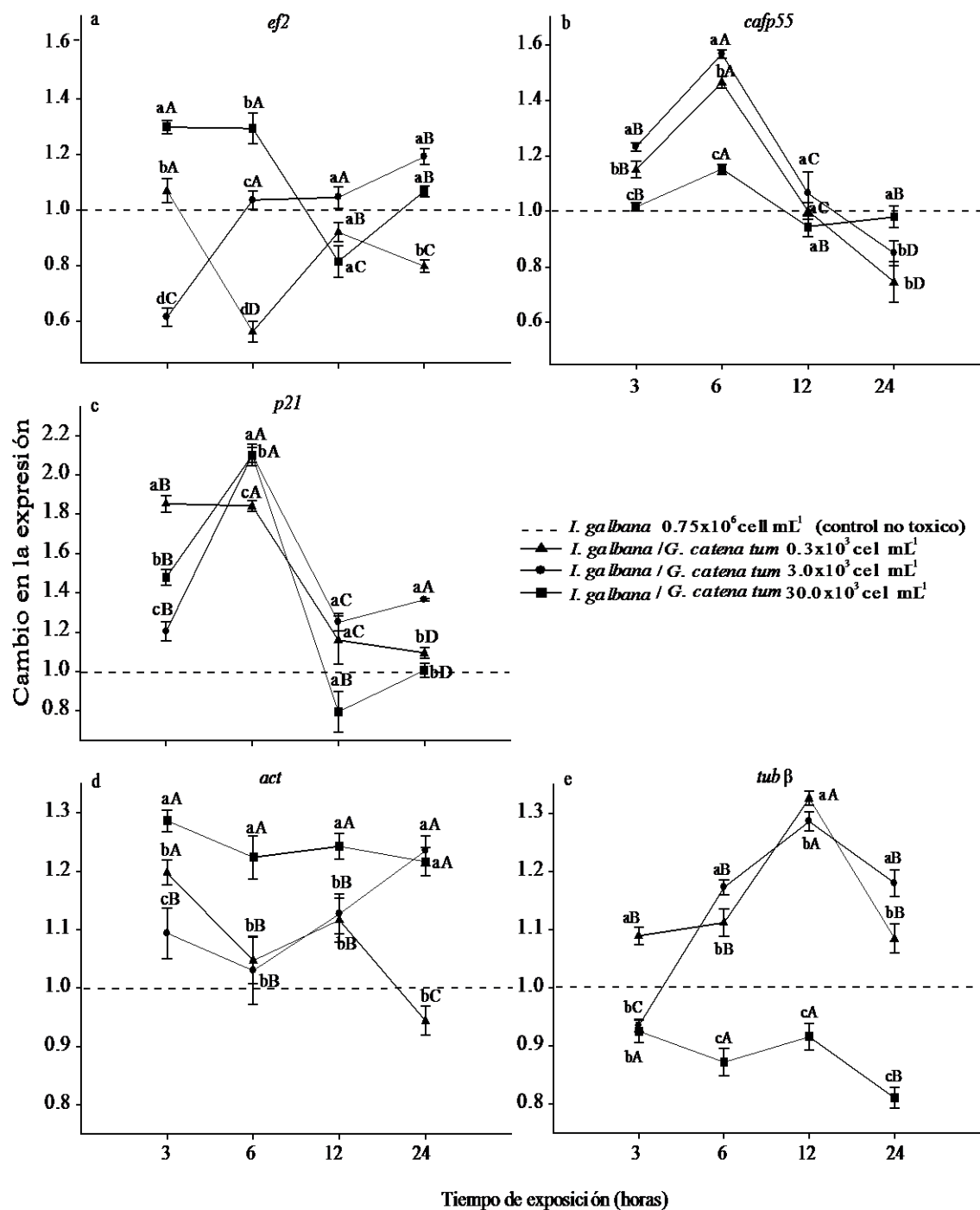
## ANEXO I

Resultados de los análisis preliminares que se realizaron para comprobar, eficiencia de la síntesis de ADNc, especificidad de los oligonucleótidos, tiempos de exposición y concentración celular con mayor efecto.



**Figura 26.** Expresión semicuantitativa (RT-PCR punto final) de genes involucrados en procesos de estrés y antioxidante en *C. gigas* expuesto a células de *G. catenatum* y células de *I. galbana* (control no tóxico). Las letras mayúsculas significan diferencias significativas dentro de un tratamiento en un tiempo determinado, las letras minúsculas indican las diferencias significativas dentro de los tratamientos y el control no tóxico.

## ANEXO II



**Figura 27.** Expresión semicuantitativa (RT-PCR punto final) de genes involucrados en la regulación del ciclo celular y citoesqueleto en *C. gigas* expuesto a células de *G. catenatum* y células de *I. galbana* (control no tóxico). Las letras mayúsculas significan diferencias significativas dentro de un tratamiento en un tiempo determinado, las letras minúsculas indican las diferencias significativas dentro de los tratamientos y el control no tóxico.