



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL
NOROESTE, S. C.

Programa de Estudios de Posgrado

**Expresión molecular de vitelogeninas en
el ostión japonés, *Crassostrea gigas***

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales

(Orientación en Acuicultura)

p r e s e n t a

Raúl Antonio Llera Herrera

La Paz, Baja California Sur, Diciembre de 2008

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 18 del Mes de Noviembre del 2008, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**Expresión molecular de vitelogeninas en el ostión japonés,
*Crassostrea gigas***

Presentada por el alumno:

RAÚL ANTONIO LLERA HERRERA

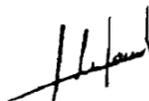
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN ACUACULTURA

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



CELIA GLORIA VAZQUEZ BOUCARD
DIRECTOR DE TESIS



DRA. SILVIA ALEJANDRA GARCÍA GASCA
CO-TUTOR



DR. ARNAUD HUVET
CO-TUTOR



DRA. THÉLMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Comité tutorial

Dra. Celia Gloria Vázquez Boucard (CIBNOR - La Paz, México) (Dir)

Dra. Silvia Alejandra García Gasca (CIAD - Mazatlán, México)

Dr. Arnaud Huvet (IFEMER, Brest, Francia)

Comité revisor

Dra. Celia Gloria Vázquez Boucard

Dra. Silvia Alejandra García Gasca

Dr. Arnaud Huvet

Jurado

Dra. Elena Palacios Metchenov

Dra. Silvia Alejandra García Gasca

Dra. Celia Gloria Vázquez Boucard

Dr. Humberto Mejía Ruíz (sup)

Lista de contenido

1	Introducción	1
2	Antecedentes.....	3
2.1	Características generales del ostión japonés	3
2.2	Importancia acuícola del ostión japonés.....	5
2.3	Biología reproductiva del ostión japonés	7
2.3.1	Anatomía de la gónada de <i>C. gigas</i>	8
2.3.2	Desarrollo gonadal y ovogénesis en	9
2.3.3	Vitelogénesis.....	12
2.3.4	Aspectos moleculares de la vitelogénesis en el ostión japonés.....	15
3.	Justificación.....	20
4.	Hipótesis.....	22
5.	Objetivos.....	22
5.1	Objetivo general.....	22
5.2	Objetivos particulares.....	23
6.	Materiales y métodos.....	23
6.1	Material biológico.....	25
6.2	Histología.....	26
6.3	Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario (ADNc).....	26
6.4	Identificación del mensajero que incluye un EST similar a vitelogenina por Northern blot.....	27
6.5	Clonación y secuenciación de ADNc del EST 2 (<i>Cg</i> -VTG2) por RACE.....	29
6.6	Análisis de expresión cuantitativo de vitelogeninas <i>Cg</i> -VTG1 y <i>Cg</i> -VTG2.....	31
6.7.1.	Estandarización de PCR tiempo real.....	32
6.7.2.	Análisis cuantitativo de expresión de vitelogeninas <i>Cg</i> -VTG1 y <i>Cg</i> -VTG2 en tejidos somáticos mediante PCR tiempo real.....	35
6.7.3.	Análisis de expresión de vitelogeninas <i>Cg</i> -VTG1 y <i>Cg</i> -VTG2 en relación al ciclo ovogénico.....	36
6.7.4.	Análisis de expresión de vitelogeninas <i>Cg</i> -VTG1 y <i>Cg</i> -VTG2 en relación al régimen alimenticio durante la maduración gonadal.....	36
6.8.	Análisis cualitativo de sitio de expresión de <i>Cg</i> -VTG2 por hibridación <i>in situ</i>	36
6.9.	Análisis estadísticos.....	37
7.	Resultados.....	40
7.1.	Identificación y ocurrencia de secuencias EST codificantes para posibles vitelogeninas en el ostión japonés.....	40

7.2.	Detección de EST similar a vitelogenina en distintos estadios del desarrollo ovogenico.....	42
7.3.	Clonación y secuenciación de ADNc de Cg-VTG2.....	44
7.4.	Análisis de expresión cuantitativo	49
7.4.1.	Estandarización de reacción de PCR en tiempo real	49
7.4.2.	Análisis cuantitativo de sitio de expresión por PCR tiempo real.....	52
7.4.3.	Análisis cualitativo de sitio de expresión por hibridación <i>in situ</i>	53
7.4.4.	Análisis de expresión cuantitativo de Cg-VTG1 y Cg-VTG2 en ciclo ovogénico.....	55
7.4.5	Efecto del régimen alimenticio durante la maduración gonadal, en los niveles de expresión de vitelogeninas CgVTG1 y CgVTG2.....	57
8.	Discusión.....	59
8.1.	Identificación y ocurrencia de secuencias EST codificantes para posibles vitelogeninas en el ostión japonés.....	59
8.2.	Caracterización parcial de secuencia primaria de Cg-VTG2.....	61
8.3.	Expresión génica de vitelogeninas Cg-VTG1 y Cg-VTG2.....	66
9.	Conclusiones	75
10.	Literatura citada.....	76
11.	Anexo.....	89

Lista de figuras

Figura 1. Descripción anatómica interna de <i>Crassostrea gigas</i>	5
Figura 2. Principales países productores de ostión japonés, <i>Crassostrea gigas</i>	6
Figura 3. Diagrama de la ovogénesis en el ostión japonés, <i>Crassostrea gigas</i>	10
Figura 4. Estadios de desarrollo ovogénico descritos en el ostión <i>Crassostrea gigas</i> , bajo los criterios de Lango-Reynoso <i>et al.</i> , (2000).....	12
Figura 5. Detección por RT-PCR de fragmentos de supuestas vitelogeninas.....	42
Figura 6. Amplificación por RT-PCR de un fragmento del EST similar a vitelogenina (CgVTG2), así como de la vitelogenina CgVTG1 en ADNc de gónadas de hembras en desarrollo temprano, maduración y en madurez total, así como en un organismo indiferenciado y en un organismo macho.....	43
Figura 7. Identificación por <i>Northern blot</i> de mensajero que incluye la secuencia del EST (CgVTG2) en ARN total de hembras vitelogénicas, machos, y organismos indiferenciados.....	44
Figura 8. Amplificación RACE de los extremos 5' y 3' del ADNc correspondientes a un EST similar a vitelogenina (CgVTG2).....	46
Figura 9. Constructo de secuencias correspondientes al extremo 3' del mensajero CgVTG2.....	47
Figura 10. Traducción conceptual de la secuencia parcial CgVTG2.....	48
Figura 11. Alineamiento de secuencia CgVTG2 con vitelogeninas de ostión CgVTG1 y de abulón HdVTG.....	48
Figura 12. Curvas de amplificación típicas para diluciones seriales de ADNc de gónada de <i>Crassostrea gigas</i> , para los genes CgVTG1 y CgVTG2.....	50
Figura 13. Curvas logarítmicas de eficacia de amplificación a partir de diluciones seriales de ADNc de gónada de <i>Crassostrea gigas</i> , para los genes CgVTG1 y CgVTG2.....	51
Figura 14. Curva de disociación térmica de amplicones correspondientes a vitelogeninas por PCR tiempo real.....	52
Figura 15. Expresión relativa de CgVTG 1 y CgVTG2 evaluada por PCR en tiempo real en distintos tejidos somáticos.....	53

Figura 16. Localización del sitio de expresión de <i>CgVTG2</i>	54
Figura 17. Expresión de <i>CgVTG1</i> y <i>CgVTG2</i> durante el ciclo ovogénico.....	56
Figura 18. Correlación en la expresión de <i>CgVTG1</i> y <i>CgCTG2</i>	57
Figura 19. Efecto de la cantidad de alimento durante el acondicionamiento gonadal en la expresión de vitelogeninas:.....	58

Lista de tablas

Tabla I. Escala reproductiva en hembras de ostión japonés <i>C. gigas</i> (Lango-Reynoso <i>et al.</i> , 2000).....	11
Tabla II. Lista de cebadores diseñados para la amplificación por RT-PCR de ESTs similares a vitelogeninas (EST 1 y 2), vitelogenina de <i>C. gigas</i> y gene de actina.....	28
Tabla III. Secuencias de cebadores empleados para el análisis de expresión por PCR tiempo real.....	34
Tabla IV. Identificación de ESTs similares a vitelogenina en bases de datos.....	41

Lista de abreviaciones

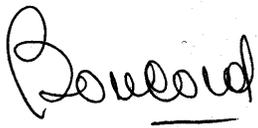
- ADN:** ácido desoxiribonucleico.
- ADNasa:** desoxiribonucleasa.
- ADNc:** ADN complementario.
- ANOVA:** análisis estadístico de varianza
- Apc:** apocrustaceaína.
- Apo:** apoproteína humana.
- ApoLP:** apolipoproteína de insectos.
- ARN:** ácido ribonucleico.
- ARNm:** ARN mensajero.
- BEt:** bromuro de etidio.
- BSA:** del inglés *bovine serum albumin* (albúmina sérica bovina)
- Ct:** del inglés *cycle of threshold* (ciclo de inicio de amplificación exponencial).
- DIG:** digoxigenina.
- dNTP:** desoxinucleótido.
- dUTP:** desoxinucleótido de uracilo.
- E:** eficiencia de reacción en PCR tiempo-real.
- Cg-ACTIN:** gen codificante para la actina de *C. gigas*.
- Cg-VTG:** gen codificante para la vitelogenina de *C. gigas*.
- Cg-EF1:** gen codificante para el factor de elongación de *C. gigas*.
- Cg-TGF1- β :** gen codificante para el *transforming growth factor* de *C. gigas*.
- FAO:** del inglés *Food and Agriculture Organization* (Organización de Naciones Unidas por la Alimentación y Agricultura).
- Hd-VTG:** gen de la vitelogenina de *Haliotis discus*.
- Kb:** kilobases.
- KDa:** kilodaltones.
- LLT:** módulo protéico *Large Lipid Transference*.
- LLTP:** familia de proteínas *Large Lipid Transfer Proteins*.
- MEP:** del inglés *Melanin Enganging Protein* (proteína estimuladora de la melanina).
- M:** molar.
- MTP:** del inglés *microsomal triglycerid transfer protein* (proteína de transferencia de triglicéridos microsomal).
- NBT/BCIP:** complejo de cloruro de nitroazul de tetrazolium y sal de 5-bromo-4-cloro-3'-indolifosfato p-toluidina
- NCBI:** del inglés *National Center for Biotechnological Information* (Centro Nacional de Información Biotecnológica).
- Og-VASA:** gen VASA específico de la gónada del ostión *C. gigas*.
- ORF:** del inglés *Open Reading Frame* (marco de lectura abierto).
- pb:** pares de bases.
- PCR:** del inglés *polimerase chain reaction* (reacción en cadena de la polimerasa).
- RACE:** del inglés *Rapid Amplification of cDNA Ends* (amplificación rápida de regiones terminales de ADNc).

RT-PCR: retrotranscripción y amplificación por PCR.
SDS-PAGE: electroforesis en poliacrilamida en condiciones disociantes.
SSC: del inglés *saline sodium citrate* (citrato de sodio salino)
SSH: del inglés *Supression Substractive Hybridization* (hibridación por supresión sustractiva).
Taq: enzima polimerasa de *Termus aquaticus*.
T°m: del inglés *Temperature of melting* (temperatura de disociación)
UR: unidades relativas de expresión génica.
UF: unidades de fluorescencia en PCR tiempo real.
UTR: del inglés *untranslated region* (región no transcrita).
VIT: gen codificante para vitelogenina.
Valor E: valor estadístico de significancia de alineamiento de dos secuencias en base de datos GenBank.
vit: proteína vitelina.
vWD: dominio protéico von Willebrand.

Resumen

La vitelogenesis es un importante proceso que involucra el transporte selectivo de proteínas y lípidos hacia los ovocitos en desarrollo. Esta función se ha atribuido a moléculas transportadoras, llamadas vitelogeninas, las cuales son lipoproteínas sintetizadas fuera del ovocito, y transportadas por sangre o hemolinfa. Existe un reporte de una secuencia completa codificante para vitelogenina en el ostión japonés *Crassostrea gigas* (Cg-VTG1; acceso GenBank AB084783), la cual es expresada en células foliculares durante los meses de activa gametogénesis. En este trabajo, se caracterizó la secuencia parcial del mensajero codificante para una nueva vitelogenina en esta especie (Cg-VTG2). Mediante análisis de la secuencia, se determinó que ambos mensajeros son codificados por genes distintos. El mensajero caracterizado en este trabajo, el Cg-VTG2 posee además un módulo común en las vitelogeninas (vWD), a diferencia del Cg-VTG1, lo cual podría implicar diferencias funcionales que deben ser analizadas posteriormente. Este segundo gen se expresa también de forma específica en células foliculares de la gónada femenina. Se realizaron análisis de expresión cuantitativa por PCR tiempo real en muestras de gónada de ostiones en distintos estadios de desarrollo ovogénico, encontrando que la expresión de Cg-VTG1 y Cg-VTG2 es máxima cuando los ovocitos se encuentran completamente maduros (estadio de madurez gonadal), indicando que participan en la vitelogenesis tardía. Se encontró una correlación altamente significativa en la expresión de ambos genes, sugiriendo mecanismos de regulación génica similares. También se notó una influencia de la condición trófica de los organismos en la expresión de vitelogeninas, en un experimento de maduración con dos regímenes alimenticios trialgales (2% y 12% de peso del ostión en peso de microalga por día) después de 60 días. Se discute la utilidad del análisis de expresión cuantitativo de vitelogeninas en estudios fisiológico-reproductivos de la especie.

Palabras claves: vitelogenina, ovogenesis, Crassostrea-gigas.



Vo. Bo. Dra. Celia Gloria Vazquez Boucard
Directora de tesis

Abstract

Vitellogenesis is an important process, involving selective transport of proteins and lipids into growing oocytes. This function has been attributed to lipid transfer proteins, named vitellogenins, which are lipoproteins synthesized outside of the oocyte and transported by blood or haemolymph. There is a report of a complete sequence coding for a vitellogenin in the Japanese oyster *Crassostrea gigas* (Cg-VTG1, GenBank access AB084783), and is expressed on follicle cells during most active gametogenesis months. In this work, a fragment sequence coding for a new vitellogenin in *C. gigas* was partially characterized (Cg-VTG2). By sequence analysis, it was determined that both messengers are coded by distinct genes. Cg-VTG2 also includes a conserved module among vitellogenins of other species (vWD) implicating a possible functional divergence which should be further analyzed. This second vitellogenin gene is expressed specifically in follicle cells of female gonad. Quantitative expression analysis was performed on oyster gonad tissues in different stages of development, showing that vitellogenin expression is maximal when oocytes are fully mature (ripe stage), indicating that protein products play an important role in late vitellogenesis. A narrow correlation was also found between both (Cg-VTG1 and Cg-VTG2) vitellogenin mRNA levels, suggesting similar regulation mechanisms of gene expression. A positive influence of the trophic condition over vitellogenins expression was also found, when oysters were matured in the laboratory under different feeding regimes of trialgal diets (2% and 12% of algal weight per oyster weight per day) after 60 days. The usefulness of quantitative gene expression analysis of vitellogenins on reproductive physiological studies is also discussed.

Keywords: vitellogenin, oogenesis, Crassostrea-gigas.

1. Introducción

El ostión japonés, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) es una especie de molusco bivalvo de gran importancia. Es la especie marina más cultivada en el mundo, así como un modelo de estudio científico representativo de la clase Bivalvia. En países como China, Japón y Francia, su cultivo depende tanto de la producción de larvas bajo condiciones controladas, como de la captura silvestre de las mismas. En el Noroeste de México, esta actividad se ha venido consolidando desde su introducción en los años setenta del siglo pasado; sin embargo, como en otras partes del mundo, han ocurrido diversas problemáticas relacionadas con mortalidades masivas de larvas y adultos, principalmente por enfermedades parasitarias y condiciones ambientales adversas (Cáceres-Martínez *et al.*, 2004), las cuales podrían tener alguna interacción con la condición metabólica, reproductiva y genética de los organismos (Samain *et al.*, 2004; Degremont *et al.*, 2005; Samain *et al.*, 2007). Ante esta problemática se ha propuesto el desarrollo de investigación relacionada con los aspectos fisiológicos de la reproducción, nutrición, inmunología, genética y desarrollo larvario, con el fin de reconocer las condiciones óptimas de cultivo y manejo.

La reproducción del ostión japonés, como en la mayoría de especies de invertebrados, involucra la presencia de gametos femeninos y masculinos, que se conjugan durante el proceso de fecundación para formar un nuevo organismo. Los gametos femeninos, llamados ovocitos, poseen en su citoplasma la mayor parte de reservas nutricias necesarias para sostener el complejo y demandante proceso de desarrollo embrionario, necesario para formar un individuo juvenil o larva. El desarrollo embrionario es un periodo de gran

demanda de energía y de moléculas necesarias para la división celular, generación de organelos y membranas biológicas, por lo que la cantidad y la calidad de reservas acumuladas durante la ovogénesis juegan un papel importante en la supervivencia larvaria (Massapina *et al.*, 1999); sin embargo, existen muy pocos trabajos que aborden las características bioquímicas y moleculares de estas reservas, así como de los mecanismos relacionados a su síntesis, transformación e incorporación dentro de los ovocitos del ostión. En otras especies de invertebrados se ha estudiado la naturaleza de los precursores vitélicos acumulados en los ovocitos, representando las vitelogeninas una importante fuente proteica de vitelo (Tsukimura, 2001; Avarre *et al.*, 2003; Hayakawa *et al.*, 2006). Las vitelogeninas son lipoproteínas específicas de hembras ovogénicas, y en algunas especies pueden existir diversas vitelogeninas codificadas por distintos genes, expresándose diferencialmente en distintos órganos, con complejos patrones de regulación de síntesis y modificaciones bioquímicas previas a su incorporación en el ovocito. Por otro lado, debido a que la síntesis de vitelogeninas se encuentra normalmente bajo la influencia de finos mecanismos endocrinos (Skippet y Hamilton, 1977), la síntesis de estas proteínas en individuos machos o juveniles también se ha sugerido como útiles marcadores de exposición y efecto ante contaminantes endocrino-alterantes (Cheek *et al.*, 2001; Puinean y Rotchell, 2006).

En este trabajo se pretende demostrar que al menos dos vitelogeninas son expresadas de forma simultánea en el ostión japonés; así como caracterizar los patrones de expresión de éstas proteínas con relación a la vitelogénesis. Asimismo se pretende ubicar su sitio de expresión, contribuyendo en el conocimiento de lipoproteínas presentes en moluscos bivalvos. Esto también permitirá incrementar el acervo de herramientas de evaluación en el estudio experimental de la regulación endógena y exógena de la vitelogénesis de esta

importante especie de bivalvo, estudiado como modelo en toxicología ambiental y de suma importancia en la acuicultura mundial.

2. Antecedentes

2.1. Características generales del ostión japonés *C. gigas*.

El ostión japonés es una especie de molusco bivalvo eurihalina, con una distribución que ocurre desde la zona intermareal hasta los 40 metros de profundidad. Habita naturalmente en zonas costeras de Asia, aunque ha sido introducido en diversos sitios costeros alrededor del mundo para su cultivo, gracias a la plasticidad fenotípica y capacidad adaptativa que presenta en distintos ambientes (Leffler y Greer, 1991). Es una especie hermafrodita secuencial, con ciclos reproductivos estacionales y con un importante rol trófico como organismo filtrador en sistemas costeros (Cognie *et al.*, 2006).

El género *Crassostrea* se incluye en la familia *Ostreidae*, que junto con las familias *Mytilidae* (mejillones), *Pectinidae* (escalopas o almejas), *Pteriidae* (ostras perleras), agrupan a las especies de bivalvos de mayor interés acuícola en el mundo. Dentro de la familia *Ostreidae*, las distintas especies de ostiones pueden ser distinguidas por características anatómicas de las valvas, que en el ostión japonés son robustas y desiguales, extremadamente rugosas y laminadas. La valva izquierda (inferior) es profundamente cóncava, con márgenes verticales. La valva derecha (superior) es plana o ligeramente convexa. Los márgenes poseen una forma irregular. La forma de la concha varía en función del ambiente; su color es blanquecino, con puntos o bandas púrpuras que radian desde la región del umbo. El interior de la concha es blanco, con una marca de músculo abductor. En cuanto a la anatomía interna (figura 1), el cuerpo se encuentra envuelto por un manto

que presenta dos pliegues laterales a eje sagital. El manto está involucrado en la síntesis de la concha y en funciones sensoriales. La masa cefálica está ausente, y no es mas representada que por la boca y palpos labiales. El estómago forma un ciego largo donde se ubica un estilete cristalino, el cual es una estructura utilizada en la digestión del alimento. El estómago continúa en un intestino y recto. La glándula digestiva es un organo que rodea al estómago, compuesto de divertículos ciegos interconectados que desembocan por canales hacia el intestino. El ostión posee un par de branquias lamelares (de aquí el nombre del grupo taxonómico *lamelibranchia*) que constan cada una de dos pliegues paralelos vascularizados. Las branquias se extienden en la región ventral, desde la boca hasta el ano, con funciones respiratoria, excretora y nutricia. La alimentación ocurre por filtración branquial de partículas suspendidas. El ostión posee un órgano muscular, el músculo abductor, empleado para la apertura y cierre de las valvas. Es un órgano masivo, situado en la parte posterior y dorsal del cuerpo, que se encuentra firmemente anclado a la cara interna de la valva. En el manto también ocurre un tipo de tejido muscular, capaz de presentar retracción ante estímulos nerviosos. Las branquias también presentan tejido muscular que permiten mantener la circulación de la hemolinfa. El sistema circulatorio es parcialmente cerrado, basado en sistemas vasculares imbricados en la masa visceral. La hemolinfa es impulsada por el corazón, ubicado en la cavidad pericárdica, adyacente al músculo abductor. El corazón impulsa la hemolinfa a través de arterias que irrigan los órganos, y la hemolinfa es colectada posteriormente en senos venosos para su paso a través de las branquias. La hemolinfa carece de pigmentos transportadores de oxígeno (FAO, 2006).

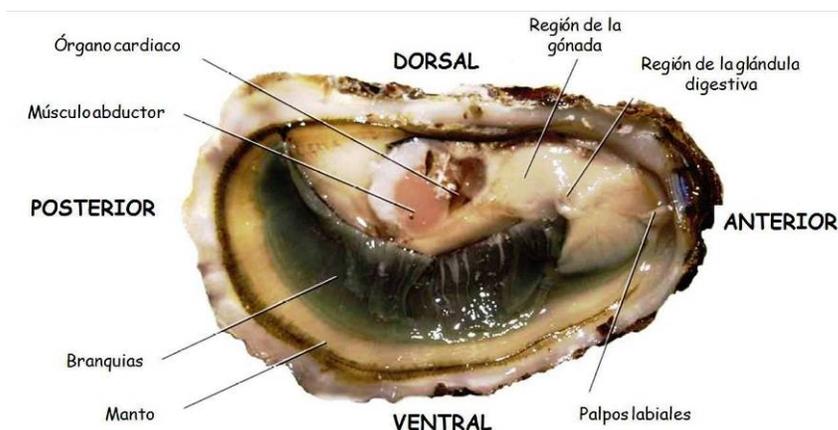


Figura 1. Descripción anatómica interna de *Crassostrea gigas*.

2.2. Importancia acuícola del ostión japonés.

La distribución original de *Crassostrea gigas* se restringe a las costas de Japón; sin embargo durante el siglo pasado, fue introducido de forma masiva en diversos sitios costeros de la franja templada y subtropical en prácticamente todos los océanos (Figura 2). Para el año 2006, la producción global fue de 4.58 millones de toneladas, superando la producción acuícola de cualquier otra especie de molusco, crustáceo y pez marino. Cerca del 85% de la producción total se concentró en China (3.89 millones de toneladas), seguido por países como República de Corea (283 mil toneladas), Japón (208 mil toneladas) y Francia (116 mil toneladas), siendo éste último país el productor europeo más importante (Robert y Gerard, 1999).

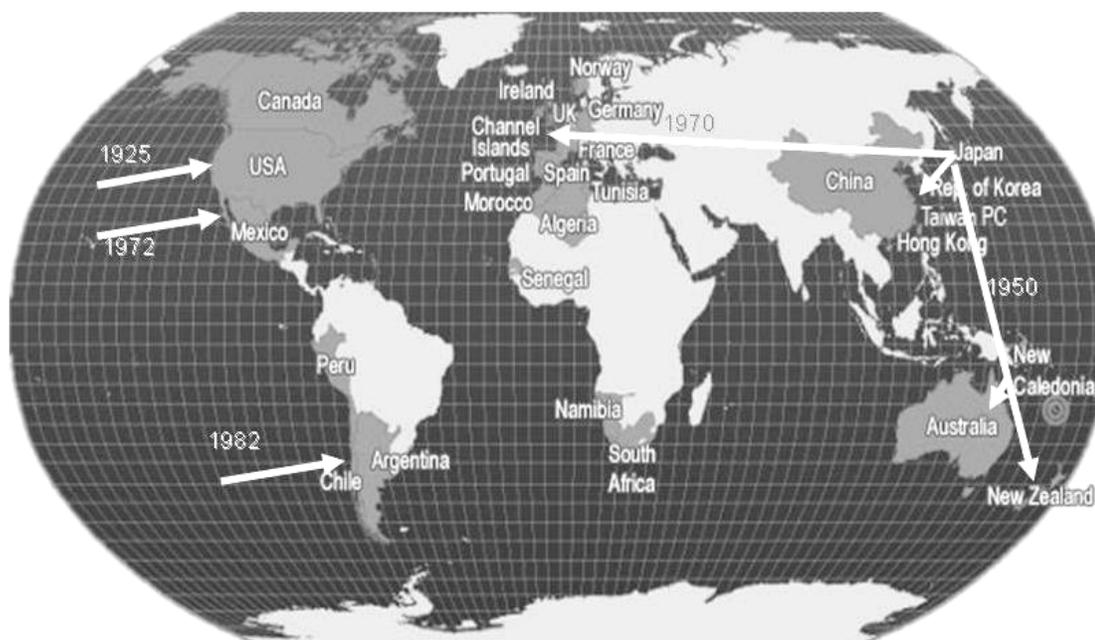


Figura 2. Principales países productores de ostión japonés, *C. gigas*, donde se muestran algunas rutas de introducción (mapa tomado de FAO, 2006; modificado con información de Barbosa, 2004).

El ostión japonés fue introducido a diversos sitios costeros del noroeste de México para la década de los setenta, y ha venido consolidándose como una actividad productiva en la región. Para 2006, México reportó una producción de 1,479 toneladas, constituyendo el 0.03% de la producción mundial (FAO, 2006). A diferencia de la tendencia de producción global, la cual se ha venido incrementando en los últimos años, la producción de esta especie en México ha tenido decrementos significativos en los años 1992-1994, así como en 1997-2000, debido a eventos de mortalidades masivas ocasionados por patógenos y condiciones climáticas (Cáceres-Martínez 2004).. El ostión japonés es la segunda especie en términos de niveles de producción en México, siguiendo básicamente un esquema de engorda en litorales a partir de semilla producida en laboratorio, a diferencia de otros países

como Francia y Japón, donde la mayor parte de la semilla (hasta el 90% del total de organismos cultivados) es colectada directamente de poblaciones silvestres (Robert y Gerard, 1999). Es importante señalar que los conocimientos tecnológicos generados en el ostión japonés, están siendo aplicados y adecuados para las especies locales de potencial importancia, como es el caso del ostión del placer *C. corteziensis*, la cual se ha adoptado como especie alternativa para producción acuícola, bajo un sistema de producción larvaria en laboratorio (J. Mazón-Suástegui, comunicación personal).

2.3. Biología reproductiva del ostión japonés, *C. gigas*.

Debido a su alto valor ecológico en algunas regiones, y por ser una de las especies de bivalvos que se cultivan bajo un sistema cerrado, se ha demostrado gran interés en el estudio de los procesos fisiológicos relacionados a la gametogénesis de esta especie, así como los factores exógenos que determinan el inicio y avance gonadal. Sin embargo, los estudios de los mecanismos relacionados a los procesos reproductivos de estos organismos son aún escasos (Croll y Wang, 2007).

El ostión japonés es una especie hermafrodita dioica alternante, con un ciclo reproductivo anual que culmina con el desove y una fertilización externa en la columna de agua (Coe, 1943; Guo *et al.*, 1998). En condiciones normales, cerca del 90% de los ovocitos fertilizados eclosionan y desarrollan un estadio de larva pediveliger en 24-48 hrs. La larva pelágica resultante es planctotrófica, la cual se alimenta y crece en este ambiente durante dos o tres semanas. Cuando la larva alcanza cierta talla, ocurre el asentamiento en un sustrato firme, acompañado de una serie de cambios morfológicos que dan lugar a un organismo juvenil de hábito sésil (Pauley *et al.*, 1988).

El desarrollo de la gónada en organismos silvestres depende en gran medida de las condiciones ambientales del medio. En general pueden observarse patrones estacionales con un sólo pico reproductivo en zonas templadas, así como distintos ciclos reproductivos durante el año en zonas de transición tropical-templado y tropicales (Chávez-Villalba *et al.*, 2007). Se considera que los principales factores ambientales que determinan el inicio y avance gonádico son la temperatura, la disponibilidad de alimento y fotoperíodo, los cuales han sido manipulados en condiciones de laboratorio para inducir la maduración en lotes destinados para la producción de larvas (Cannuel y Beninger, 2005; Chávez-Villalba *et al.*, 2002; Chávez-Villalba *et al.*, 2003; Fabioux *et al.*, 2005).

2.3.1. Anatomía de la gónada de *C. gigas*.

La anatomía de la gónada del ostión japonés es un tanto similar a la del resto de las especies de ostiones, tanto a nivel microscópico como macroscópico (Pauley *et al.*, 1988). La gónada es un órgano cuya dimensión y morfología varía a lo largo del año. El ostión japonés es una especie hermafrodita protándrica alternante, desarrollando generalmente una gónada masculina durante la primera temporada reproductiva y generalmente una gónada de tipo femenino en la consecuente temporada reproductiva, aunque hay una proporción de individuos que mantienen gónada masculina en la segunda madurez. Es relativamente común observar una proporción de individuos morfológicamente hermafroditas, cuando gametos femeninos y masculinos ocurren simultáneamente. Sin embargo, la proporción de hermafroditismo funcional es generalmente baja, alrededor de 1.3% (Gong *et al.*, 2004). Al comienzo de su desarrollo, la gónada femenina consiste en cúmulos de células germinales indiferenciadas entre tejido conectivo de manto, llamadas células primordiales

germinales. Conforme la gonadogénesis progresa, ésta se divide en dos lóbulos laterales al eje sagital, rodeando la glándula digestiva. También se comienza a distinguir la estructura básica tipo acino a nivel microscópico. En corte trasversal, los acinos en desarrollo muestran una estructura circular, presentando una delimitación con el tejido vesicular conjuntivo adyacente por el epitelio basal germinal, con ovocitos en desarrollo anexos a la membrana interna, y un lumen central donde los ovocitos ya madurados son mantenidos hasta el desove. Conforme el desarrollo de la gónada progresa, los acinos se interconectan en el margen exterior de la masa visceral, adyacente a la región interna del manto, formando canales de desove que desembocan en la cavidad paleal. Las células foliculares de la gónada del ostión son pequeñas células accesorias que se encuentran cercanas al epitelio basal del acino, en estrecha relación con los ovocitos en vitelogénesis, y cuya función no ha sido precisada. Se sugiere que juegan un papel en la transferencia y biotransformación de moléculas nutritivas al ovocito y no presentan diferenciación morfológica a lo largo de la ovogénesis (Eckerbarger y Davis, 1996).

2.3.2. Desarrollo gonadal y ovogénesis en *C. gigas*.

La gametogénesis es el conjunto de procesos que conducen a la formación de gametos femeninos (ovogénesis) y masculinos (espermatogénesis). La ovogénesis comprende principalmente dos etapas: una fase de división mitótica de células germinales diploides, y una fase meiótica de diferenciación en gametos funcionales haploides. Es posible entonces considerar a la ovogénesis desde dos perspectivas: los eventos nucleares de división genómica y haploidización, y las fases de maduración citoplasmática que son muy evidentes en la morfología celular de los ovocitos en desarrollo (figura 3).

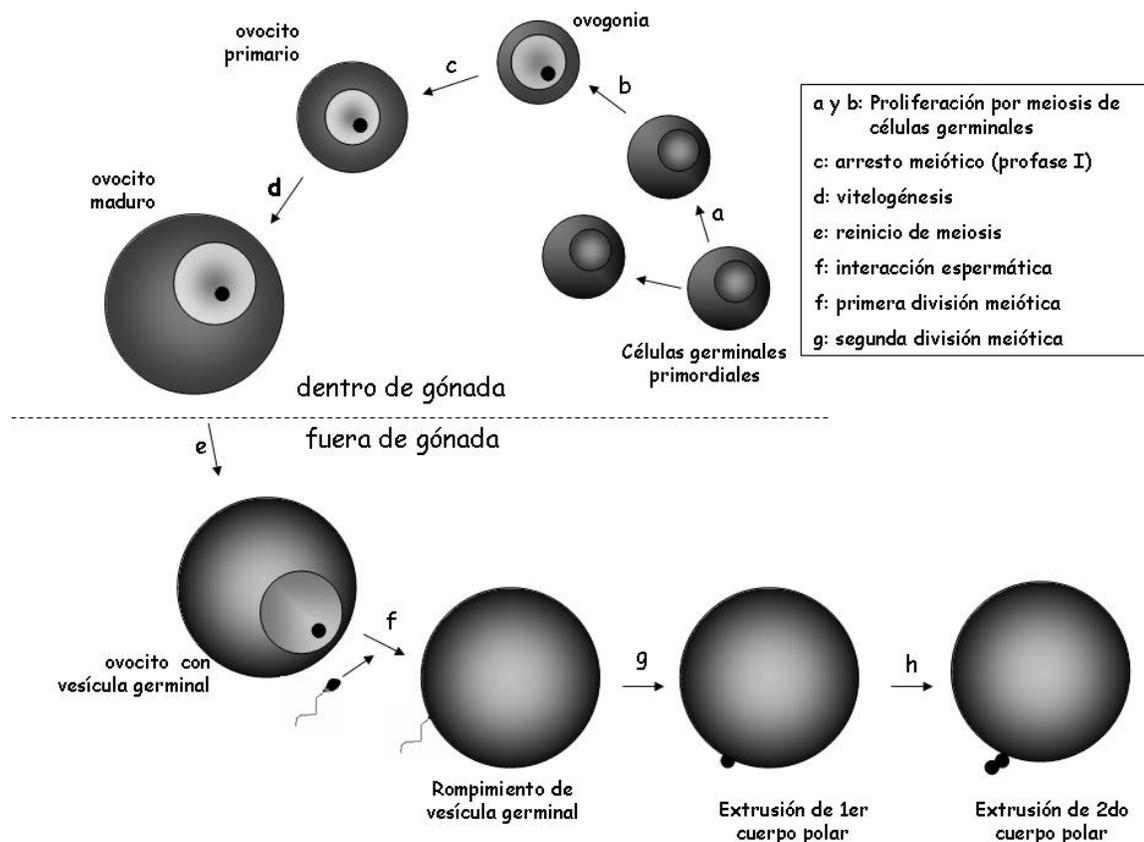


Figura 3. Diagrama de la ovogénesis en el ostión japonés, *C. gigas*.

Posterior a la división mitótica, las gonias (u ovogonias para el caso particular de la ovogénesis) se diferencian en ovocitos primarios (ovocitos I), dando inicio a la meiosis (figura 3c). A nivel nuclear, la duplicación del ADN nuclear se lleva a cabo, y los cromosomas homólogos se aparean. En este momento, la meiosis se arresta a nivel profase, por un período que dura en orden de días o semanas en condiciones naturales de maduración gonadal. Durante este período se lleva a cabo la vitelogénesis, que es la incorporación citoplásmica de reservas nutricias para el futuro embrión. Este período de desarrollo ovogénico se lleva a cabo dentro de la gónada; el desove y fertilización de los ovocitos son señales celulares que determinan la continuación meiótica, posiblemente

mediante flujos iónicos intracelulares (Colas y Dube, 1998). Una vez reiniciada la meiosis, los cromosomas se condensan de nuevo, la membrana nuclear desaparece, y el material génico replicado se segrega en dos polos o regiones, uno de ellos formará el núcleo del ovocito secundario, mientras que el otro dará lugar al primer cuerpo polar mediante una división asimétrica celular. La segunda división meiótica se lleva a cabo sin la replicación del material nuclear, lo que determina la generación de células haploides posterior a la expulsión de un segundo cuerpo polar. Esta fase meiótica se lleva a cabo durante la interacción con el espermatozoide, desde la fertilización hasta la fecundación (Fabioux, 2004).

Lango-Reynoso *et al.* (2000) establecieron una escala con base en variables morfométricas cuantitativas y rasgos histológicos mencionados anteriormente, y que describen el desarrollo ovogénico para *C. gigas* (tabla I). La morfología típica de cada estadio de desarrollo se muestra en la figura 4.

Tabla I. Escala reproductiva en hembras de ostión japonés *C. gigas* (Lango-Reynoso *et al.*, 2000).

Estadio	Intervalo de talla de ovocitos (μm)	Descripción histológica
Desarrollo temprano	3.0 - 12.0	Folículos elongados y frecuentemente aislados entre tejido conectivo abundante, con paredes que consisten en ovocitos primarios de tamaño homogéneo.
Maduración (vitelogénesis temprana)	12.1 - 30.0	Inicio del crecimiento de ovocitos; Se puede observar un gran intervalo de distintos tamaños de ovocitos en todos los estadios gametogénicos, incluyendo algunos ovocitos libres. El tejido conectivo interfolicular desaparece.
Madurez (Vitelogénesis tardía)	30.1 - 41.0	Folículos completamente llenos de ovocitos maduros con núcleo distinguido; relativamente homogéneos en tallas.
Post-desove (degeneración)	41.1 - 60.0	Folículos conteniendo ovocitos degenerados, frecuentemente con forma alargada, e incluso rotos. Se observa un evidente re-desarrollo indicado por un incremento en el número de ovocitos primarios.

El conocimiento de los procesos relacionados al desarrollo ovogénico, y en particular a los relacionados a la división y segregación cromosómica, han permitido un manejo zootécnico de la especie. Por ejemplo, el arresto de la liberación del segundo cuerpo polar mediante agentes químicos conduce a la generación de progenie triploide, con sustanciales beneficios en la tasa de crecimiento e incremento de valor de producto (Guo *et al.*, 1992; Longo *et al.*, 1993; Gong *et al.*, 2004).

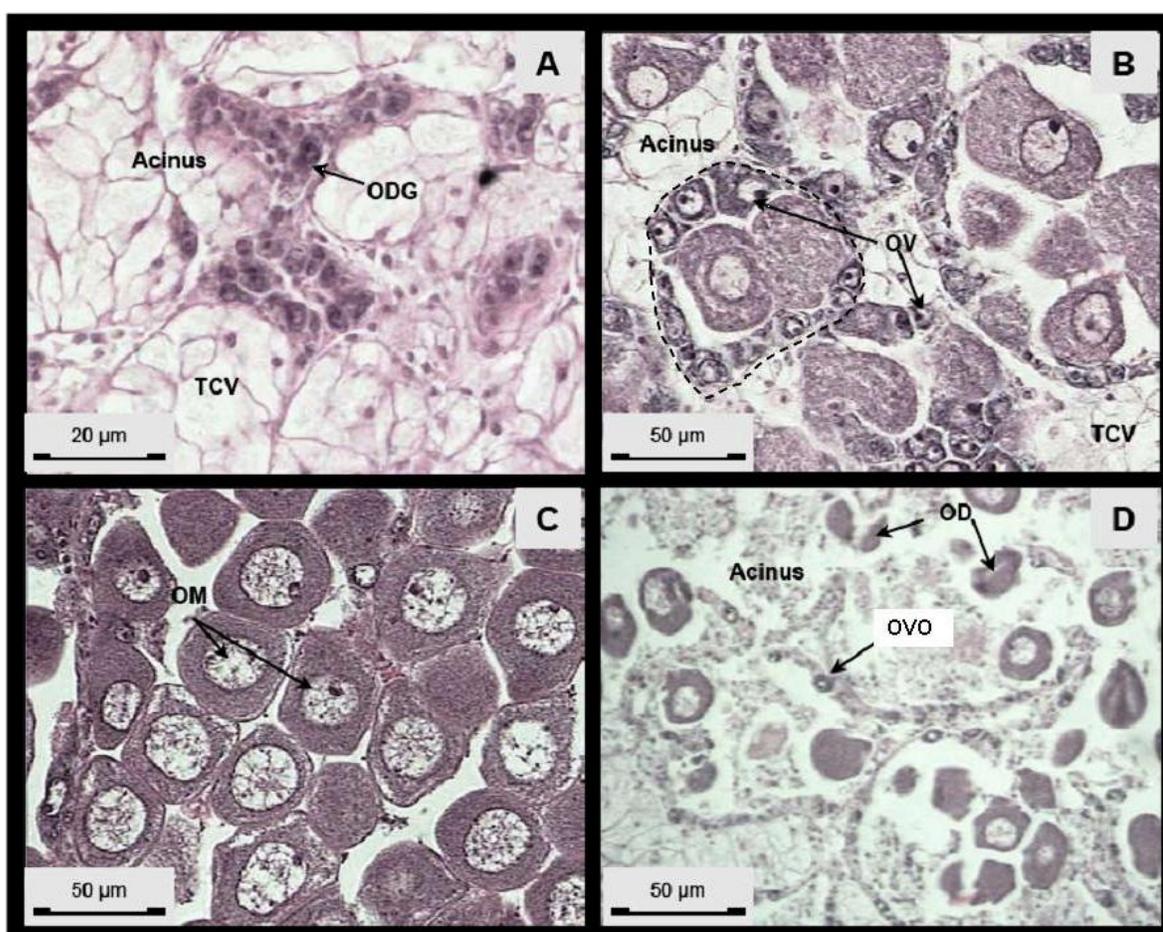


Figura 4. Estadios de desarrollo ovogénico descritos en el ostión *C. gigas*, bajo los criterios de Lango-Reynoso *et al.*, (2000). A: desarrollo temprano, donde se observan cúmulos de células germinales en división mitótica, con algunos ovocitos en inicio de gametogénesis (ODG) y abundante tejido conectivo vesicular (TCV). B: vitelogénesis, donde se observa la estructura del acino (delineada) con ovocitos vitelogénicos (OV). C: estadio de madurez, con ovocitos libres en el lumen del acino. D: estadio de regeneración pos-desove, con

restos de ovocitos maduros en estado de reabsorción (OD), así como ovogonias diferenciadas de células germinales. Imágenes tomadas de Chávez-Villalba (2001).

2.3.3. Vitelogénesis.

Como se ha mencionado, la vitelogénesis es un proceso que ocurre dentro de un período de ciclo celular de relativa inactividad nuclear, pero con profundas implicaciones en la apariencia citoplasmática del ovocito. Las reservas incorporadas serán empleadas durante el período de desarrollo embrionario donde la larva es incapaz de alimentarse por sus propios medios, por lo que la eficiencia en la incorporación de vitelo determina la viabilidad de la progenie (Massapina *et al.*, 1999; Valdez-Ramírez *et al.*, 2002). En el caso particular de moluscos bivalvos, se ha estudiado la naturaleza bioquímica de los ovocitos del ostión del Atlántico (*C. virginica*), encontrando una concentración relativamente elevada en proteínas (40-50%); mientras que los lípidos y carbohidratos representan 14-21% y 7-9%, respectivamente (Lee y Heffernan, 1991). Para los ovocitos de *C. gigas*, Kang *et al.*, (2003) reportan una composición de 41% de proteína, 11.7% de carbohidratos y 25.5% de lípidos. Los lípidos se localizan comúnmente en forma de agregados o gotas dentro de los ovocitos, constituidos fundamentalmente por triglicéridos. La acumulación de estos tipos moleculares ocurre mediante procesos secuenciales, en función al tipo de molécula incorporada. Raven (1961) menciona como regla general para todos los ovíparos, que existen dos fases principales de vitelogénesis, en función de la naturaleza del material incorporado. En la primera fase, denominada vitelogénesis temprana, se incorporan carbohidratos y lípidos. La segunda fase corresponde a la incorporación de materia proteica, donde las vitelogeninas son las principales moléculas incorporadas. En algunos casos, es posible observar una fase intermedia de incorporación de carbohidratos.

Aunque se puede considerar el papel de moléculas vitelinas como una fuente de lípidos para el ovocito en desarrollo, se desconoce la magnitud de esa aportación en términos energéticos, así como los mecanismos alternativos de incorporación de lípidos y proteínas en ovocitos de bivalvos. En otros modelos de invertebrados, se observa una variedad de procesos de incorporación de lípidos, tanto dependientes como independientes de la incorporación de lipoproteínas por endocitosis. Por ejemplo, Ziegler y Van Antwerpen (2006), realizaron una extensa revisión de los mecanismos de incorporación de lípidos en ovocitos de insectos, enunciando que en la mayoría de las especies estudiadas, el principal mecanismo de incorporación de ácidos grasos libres y diacilglicéridos en ovocitos ocurre por proteínas transportadoras a nivel de membrana celular. También menciona que las lipoproteínas, de la familia de lipoporinas, y las vitelogeninas, contribuyen de forma minoritaria en el total de material lipídico.

El vitelo proteico se conforma principalmente a partir de la incorporación de vitelogeninas, mediante un proceso de endocitosis mediado por receptores. Este proceso es fundamentalmente conservado en la mayoría de los organismos ovíparos, y ha sido extensivamente estudiado a distintos niveles en peces óseos y en algunos grupos de invertebrados como insectos, crustáceos y nemátodos (Chen *et al.*, 1997; Sappington y Raikhel, 1998, Babin *et al.*, 1999; Smoolenars *et al.*, 2007). En bivalvos, el conocimiento a nivel bioquímico y molecular, así como el o los sitio(s) de síntesis de las proteínas involucradas en la ovogénesis es muy limitado. La mayor parte de la información ha sido generada por técnicas indirectas como la histología, histoquímica y electromicroscopía (Pipe, 1987; Dorange y Le Penec, 1989; Guallejac *et al.*, 2005, Eckerbalger y Davis, 1996, Rodríguez-Jaramillo, 2004).

Pipe (1987) mencionó que la síntesis de vitelo proteico del mejillón *Mytilus edulis* es un proceso que ocurre en el propio ovocito, sustentado en las observaciones del aparato de Golgi y de retículo endoplásmico rugoso bien desarrollado. Ecklbarger y Davis (1996) ampliaron la idea de que la vitelogénesis es un proceso tanto autosintético (dentro del ovocito) como heterosintético (en tejido somático), basándose en observaciones ultraestructurales del ovocito en desarrollo de *C. virginica*. Estos autores describen estructuras de síntesis proteica en el ovocito en desarrollo, como el retículo endoplásmico rugoso rodeando el núcleo de los mismos, así como gránulos densos cercanos al aparato de Golgi. Estas observaciones sugieren que el vitelo proteico en *C. virginica* podría ser producto de dos tipos de síntesis: (1) endógena (empaquetamiento proteico de los ovocitos) y (2) exógena (estructuras endocíticas en la membrana del ovocito).

Suzuki y colaboradores (1992) describieron la ocurrencia de una proteína globular específica de gónada femenina del ostión *Crassostrea gigas*, de aproximadamente 530 kDa. Su caracterización bioquímica indicó que se constituye por distintas subunidades (105, 85, 66, 64, 60, 45 y 41 kDa). Mediante métodos inmunohistoquímicos observaron que es extensamente acumulada dentro de los ovocitos maduros, y debido a que únicamente la gónada mostró reacción cruzada con el anticuerpo generado de la proteína purificada, sugirieron que éste órgano sería el sitio de síntesis de la vitelina reconocida. Li *et al.*, (1998) determinaron por métodos analíticos que esta proteína se degrada dentro de las primeras 48 horas posteriores a la fertilización, y proponen que los aminoácidos libres que la constituyen son fuentes energéticas de primordial importancia en el desarrollo embrionario y larvario.

2.3.4. Aspectos moleculares de la vitelogénesis en el ostión japonés *C. gigas*.

Como se mencionó en el apartado anterior, la vitelogénesis ha sido estudiada a nivel bioquímico, empleando estrategias de separación desarrolladas en un principio para el estudio de lipoproteínas de plasma en humanos, como ultracentrifugación, separación cromatográfica y mediante electroforesis. Esto permitió un gran avance del conocimiento del transporte, almacenamiento y degradación del vitelo, así como las modificaciones de los precursores posterior a su síntesis, principalmente en especies de crustáceos peneidos, insectos, nemátodos y peces (Ziegler y van Antwerpen, 2006). Sin embargo, estas técnicas han tenido limitaciones para responder a otras preguntas relacionadas a la evolución, diversidad, sitio de síntesis y regulación de expresión de los genes que las codifican. El avance de las herramientas moleculares, sobre todo en el análisis de expresión génica, hibridación de ácidos nucleicos y análisis bioinformático de secuencias completas, han permitido profundizar en el conocimiento de estos aspectos, en grupos que incluyen especies intensamente estudiadas como peces, insectos, nemátodos y crustáceos peneidos. Los moluscos pertenecen a una rama evolutiva denominada Lophotrochozoa, que, junto con Ecdysoa, conforman el vasto grupo de invertebrados protostomados (Valentine, 1997; Adoutte *et al.*, 2000). Sin embargo, el conocimiento a nivel genómico de especies pertenecientes a Lophotrochozoa se encuentra mucho más rezagado. Particularmente para moluscos bivalvos, la información genómica disponible es muy reducida (Saavedra, 2006). Sin embargo, se han realizado grandes esfuerzos entre grupos de investigación europeos y americanos para proponer a las especies *C. gigas* y *C. virginica* como modelos en la generación de herramientas moleculares, incluyendo el desarrollo de plataformas comunes de microarreglos y generación de bases de datos de etiquetas genes expresados (también

llamados ESTs; *Expressed Sequence Tags*) e incluso la propuesta de secuenciación completa de sus genomas (Hedgecock *et al.*, 2005; Jenny *et al.*, 2007; Cunningham *et al.*, 2006). A pesar de que la secuenciación completa de los genomas de especies de ostión no se ha realizado, algunos grupos de investigación han generado información genómica parcial relativa a procesos reproductivos en bivalvos, debido a su obvio interés de aplicación acuícola (Matsumoto *et al.*, 2003, Rodet *et al.*, 2005; Bernay *et al.*, 2006, Fabioux, 2004; Fabioux *et al.*, 2004a, 2004, 2005, Matsumoto *et al.*, 2007, Fleury *et al.*, 2008; Boutet *et al.*, 2008, Rodet *et al.*, 2008) .

La única secuencia completa correspondiente a vitelogenina descrita en alguna especie de bivalvo ha sido aislada precisamente en *C. gigas* (Cg-VTG1 Acceso GenBank AB084783; Matsumoto *et al.*, 2003). Además de este reporte, se han descrito secuencias parciales en especies de *Patinopecten yessoensis* (Acceso GenBank AB055960; Osada *et al.*, 2004) y de *Mytilus edulis* (Acceso GenBank AAT72932; no publicado), las cuales componen la única información a nivel molecular de lipoproteínas precursoras de vitelo en ovocitos de moluscos bivalvos. La vitelogenina aislada en *C. gigas* fue identificada en gónada, ubicando el sitio de síntesis en células foliculares. El producto proteico de la secuencia parcial de *P. yessoensis* fue detectado en células accesorias de las paredes foliculares de la gónada femenina (análogas a las células foliculares de *C. gigas*). El mensajero parcial identificado en *M. edulis* fue aislado de tejido de gónada, a partir de secuencias degeneradas de las secuencias de vitelogeninas reportadas en *C. gigas* y *P. yessoensis*.

Estudios recientes muestran evidencias de posibles mensajeros correspondientes a vitelogeninas distintas a la anteriormente descrita en el ostión japonés. David y colaboradores (2005) generaron una colección de secuencias parciales de ARNm

correspondientes a genes expresados diferencialmente por estrés hipóxico. Esta colección se generó a partir de tejidos de glándula digestiva y gónada de ostiones *C. gigas*, empleando técnicas de análisis extensivo sobre el transcriptoma (genotecas SSH), y en ella se ha reconocido un fragmento corto (302 pb, acceso GenBank CX069172) que presenta similitud con vitelogeninas de insectos, nemátodos y vertebrados. Posteriormente se reconoció un EST de mayor longitud (667 p.b.) en una base de datos privada del programa AQUAFIRST (<http://aquafirst.vitamib.com/>) que incluye la secuencia del EST similar a la vitelogenina referido anteriormente (A. Huvet, comunicación personal). Mediante alineamientos preeliminares de este EST con las secuencias proteicas similares completas reportadas en las bases de datos, se denota una similitud con un dominio conservado conocido como Factor von Willebrand (vWD), ubicado en la región 3' dentro del marco de lectura del ARN mensajero codificante para la vitelogenina del gasterópodo *Haliothis discus hannai*. Sin embargo, no existe similitud con la secuencia conocida de vitelogenina para *C. gigas* reportada por Matsumoto *et al.*, (2003), lo que sugiere la presencia de al menos dos mensajeros codificantes para vitelogeninas en esta especie, aunque no es posible saber si son resultado de dos genes distintos, o de un mismo gene transcrito mediante *splicing* alternativo. En otro trabajo, Anguiano-Vega (2008) generó una genoteca de ESTs (ADNc) tipo SSH de glándula digestiva de *C. gigas*, encontrando también una secuencia similar a vitelogenina de peces, sin similitud aparente con la secuencia de vitelogenina de ostión. Estos reportes se consideran como evidencia directa de múltiples vitelogeninas en el ostión japonés. La presencia de múltiples genes codificantes para vitelogeninas, expresándose independientemente durante la ovogénesis, ha sido comprobado en insectos, crustáceos, nemátodos, de forma extendida en distintas especies de peces óseos. En la mosca de la

fruta, *Drosophila melanogaster* existen tres genes codificantes para vitelogeninas, denominadas por los autores como *yolk proteins* (Hung y Wensink, 1981). En la especie de crustáceo *Metapenaeus ensis* se han identificado dos lipoproteínas precursoras de vitelo, sintetizadas independientemente en ovario y hepatopáncreas, en períodos distintos del desarrollo gonádico (Tsang *et al.*, 2003; Kung *et al.*, 2004). En el nematodo *Caenorhabditis elegans*, se han descrito seis genes que podrían codificar para vitelogeninas, los cuales presentan incluso diferencias en las regiones no codificantes que regulan su expresión (Winter *et al.*, 1996). En las especies de peces estudiadas, se ha encontrado que, si bien los genes de vitelogenina son regulados por el mismo tipo de hormona esteroidea (principalmente estradiol), cada gen se expresa independientemente durante la vitelogénesis (Wang *et al.*, 2005; Sawaguchi *et al.*, 2005; Sawaguchi *et al.*, 2006) e incluso se ha observado que los productos protéicos correspondientes tienen funciones distintas durante el desarrollo embrionario (Finn y Kristoffensen, 2007). Este conjunto de evidencias mencionan algún grado de independencia en los patrones de expresión, tanto espacial como temporal, de las distintas lipoproteínas del tipo de las vitelogeninas presentes en una misma especie, lo que sería interesante demostrar en el ostión japonés, toda vez que se caracterice en un primer momento la existencia de más de una vitelogenina expresada en su transcriptoma.

3. Justificación

El estudio de las bases fisiológicas de síntesis de reservas nutricias para los ovocitos permite un mejor entendimiento de la dinámica metabólica relacionada a la partición bioenergética entre reproducción y crecimiento, por lo que el análisis de expresión de vitelogeninas permitirá indicar la fase crítica de síntesis de vitelo protéico durante el ciclo ovogénico, cuando se infiere que existe una condición de depresión fisiológica. Esta condición promueve que los individuos sean vulnerables a condiciones de estrés ambiental, lo que ha sido relacionado con eventos de mortalidades masivas (Samain *et al.*, 2007). Por otra parte, debido al potencial de crecimiento en la producción de ostión japonés, es necesario generar tecnologías que optimicen cada componente de la línea de cultivo, de particular importancia los relacionados a la obtención, condicionamiento y maduración de reproductores en laboratorio para generación de larvas. El conocimiento básico de la modulación de la vitelogénesis, así como el desarrollo de herramientas bioquímicas y/o moleculares para analizar el avance ovogénico o esfuerzo reproductivo, podría ser incorporado al desarrollo de técnicas de maduración de reproductores en laboratorio. La extensión del conocimiento en estos aspectos reproductivos pueden ser aplicados incluso a otras especies locales de interés comercial y productivo (p. ej., el ostión del placer, *C. corteziensis*), lo que fomentaría el potencial de producción ostrícola regional, y reduciría los riesgos ecológicos de la dependencia de especies exóticas.

Por otro lado, existe una tendencia en el campo de la ecotoxicología en el uso de especies bioindicadoras de salud ambiental y presencia de contaminantes, así como en el desarrollo de marcadores biológicos de exposición a éstos. Uno de los grupos de compuestos

contaminantes que ha sido objeto de mucha atención por los investigadores, es el de los compuestos endocrino-alterantes, los cuales se definen como agentes químicos exógenos que interfieren en la síntesis, secreción, transporte, interacción, acción o eliminación de hormonas naturales en el organismo, las cuales son responsables del mantenimiento de la homeostasis, reproducción, desarrollo y/o comportamiento (Crisp *et al.*, 1998). Los efectos de los compuestos endocrino-alterantes se han diagnosticado en organismos acuáticos, principalmente en peces, debido a que en este grupo de organismos los procesos endocrinos normales están bien descritos. Sin embargo, existe un creciente interés en determinar el potencial ecotoxicológico de estos compuestos en invertebrados marinos (Hutchinson, 2002; Jobling *et al.*, 2003; Iguchi *et al.*, 2006). Los moluscos bivalvos han sido propuestos como especies centinela de efectos de contaminantes químicos en el ambiente (Ortiz-Zaragoitia *et al.*, 2006; Porte *et al.*, 2006; Janer y Porte, 2007), y la cuantificación de la expresión de los genes codificantes para vitelogeninas, podrían validarse en un futuro como biomarcadores de exposición y efecto de compuestos endocrino-alterantes.

Finalmente, el ostión japonés, *C. gigas*, ha sido propuesto como una especie modelo de gran importancia para el entendimiento evolutivo de la rama *lophocotrozoa*, la cual ha sido muy poco estudiada en comparación a especies de la rama de los *ecdysoa*. La caracterización molecular de vitelogeninas en el ostión japonés, aporta conocimiento a la diversificación evolutiva de la familia de lipoproteínas en este clado de animales protostomados.

4. Hipótesis

La diversidad de precursores proteicos de vitelo en el ostión japonés, *C. gigas*, observada a nivel bioquímico en trabajos anteriores, así como la evidencia reportada a nivel genómico para especies de otros *phyla*, sugiere la ocurrencia de diversas vitelogeninas en el transcriptoma de esta especie de ostión. Los niveles de ARN codificante para cada una de éstas proteínas conservan alguna relación al ciclo ovogénico, principalmente dentro del período de vitelogénesis tardía.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es demostrar la existencia de al menos dos vitelogeninas expresadas durante la vitelogénesis del ostión japonés, *C. gigas*.

5.2. Objetivos particulares

- Caracterizar la secuencia completa a nivel ADNc de un fragmento de secuencia expresada (EST) similar a vitelogenina en *C. gigas*.
- Localizar la expresión de un EST similar a vitelogenina en distintos tejidos de *C. gigas*.
- Conocer la dinámica de expresión con relación al ciclo ovogénico de vitelogeninas *Cg-VTG1* y *Cg-VTG2*.
- Evaluar el efecto del régimen alimenticio durante la maduración gonadal, en los niveles de expresión de *Cg-VTG1* y *Cg-VTG2*.

6. Materiales y métodos

6.1. Material biológico

Para la detección de ESTs similares a vitelogeninas en órganos viscerales de ostión mediante RT-PCR y *Northern blot*, se colectaron 30 organismos adultos (*C. gigas*) en el mes de Mayo de 2007. Los organismos provenían de una granja de cultivo en Sonora, México, con una longitud promedio de 11.3 ± 3.1 cm. Los organismos se sacrificaron y disecaron en el laboratorio y se realizaron dos cortes trasversales a la altura de la glándula digestiva. Una porción de tejido se preservó en solución comercial *RNAlater* (Ambion, EU) a 4°C, y otra porción se conservó en solución de Davidson para análisis histológicos. Cabe mencionar que se decidió iniciar la búsqueda de la expresión de los ESTs similares a vitelogenina en toda la masa visceral debido a que no se conocía su correspondiente sitio de expresión.

Para la amplificación de los extremos terminales de un EST similar a vitelogenina expresado en masa visceral de *C. gigas* (*Cg-VTG2*), se colectaron organismos hembras en estadio de madurez gonadal mantenidos en la unidad de IFREMER (Institut Francais de Recherche de la Mer) Argenton, Francia. La talla promedio de los organismos fue de 9.5 ± 1.4 cm. Se realizaron colectas individuales de gónada madura, preservando 100 mg de tejido en solución de extracción de ARN *Extract-All* (Eurobio, UE) en hielo para su inmediata extracción de ARN total. La madurez gonadal fue evaluada al momento de la disección mediante frotis del tejido gonadal y observación directa al microscopio.

Para los análisis de expresión de vitelogeninas en distintos tejidos somáticos, se emplearon muestras de ADNc generadas a partir de "pools" (pozas, mezclas) del mismo tejido

(glándula digestiva, palpos labiales, branquias, manto, borde de manto, músculo liso, músculo estriado, ganglio visceral, hemocitos). Se emplearon cuatro pools por tipo de tejido, y cada pool incluye cantidades similares de tejido de seis organismos. Estas muestras fueron preparadas y analizadas previamente por Fleury *et al.*, (2008), para el análisis de expresión del gen *Cg-TGF- β* .

Para el análisis de expresión de vitelogeninas durante el ciclo ovogénico por el método cuantitativo de PCR tiempo real, se emplearon muestras de ADNc sintetizadas a partir de ARN total de gónada de hembras en distintos estados de vitelogénesis. Las condiciones de maduración obedecen a un diseño experimental que simula las condiciones ambientales naturales de la Bahía Marennes-Oléron, en el este de Francia, tal como se describe en Fabioux *et al.* (2004). Los organismos fueron mantenidos durante un ciclo anual (Febrero 2002-2003) en la unidad experimental de IFREMER y alimentados *ad libidum*, con dietas polialgales (33% de una mezcla de *Chaetoceros calcitrans* y *Skeletonema costatum*, 33% de *Isochrysis galbana*, 33% *Tetraselmis chui*), realizándose muestreos mensuales en primavera del 2003 para asegurar la ocurrencia de hembras en distintos estadios de desarrollo. Para cada muestreo mensual, se conservaron porciones transversales para análisis histológico, y se preservó un fragmento de gónada en solución comercial de purificación de ARN total *Extract-All* (Eurobio, UE) a -20° para posteriores análisis de expresión génica. Estas muestras fueron preparadas y analizadas en trabajos anteriores para la expresión de los genes *Og-VASA* (Fabioux *et al.*, ²⁰⁰⁵~~2004~~) y *Cg-TGF- β* (Fleury *et al.*, 2008). La calibración entre ensayos del PCR en tiempo real se realizó con una muestra de ADNc sintetizada a partir de masa visceral de ostiones en gametogénesis activa, empleada en Fleury *et al.*, (2008).

Para evaluar el efecto del régimen alimenticio sobre la maduración gonadal del ostión, se empleó una población experimental producida en la estación experimental de IFREMER, La Tremblade, Francia, en primavera del 2006. Cuando los organismos alcanzaron un año de edad, dio inicio el experimento (Marzo de 2007). Los organismos fueron mantenidos en acuarios de 80 L, con recambio de agua continuo, a 19°C. Los organismos fueron sometidos a tres condiciones tróficas distintas. La dieta proporcionada fue trialgal, compuesta por *Isochrysis galbana*, *Rhodomonas salina* y *Thalassiosira weissiflogii*, proporcionando 2% y 12% de peso seco de microalga por peso seco promedio de los organismos por día. De aquí en adelante, se hará referencia a estos grupos experimentales como "alto" (2%) y "bajo" (12%). Después de 60 días, se colectaron 20 organismos de cada condición trófica, y los organismos fueron sacrificados y disecados. Se conservaron porciones transversales a nivel medio para análisis histológico y de hibridación *in situ*, así como porciones de gónada para posteriores análisis de expresión génica de vitelogeninas por medio de PCR tiempo real.

6.2. Histología

Las porciones de órganos viscerales destinadas para análisis histológicos fueron fijadas por 24 hrs en solución Davidson (Shaw y Battle, 1957), posteriormente deshidratados en una serie de alcoholes en concentración creciente (70%, 80%, 90% y 100%), y finalmente incluidos en parafina. Se realizaron cortes histológicos de 5 µm de grosor y se tiñeron con hematoxilina-eosina para determinar su sexo y desarrollo gonadal. La clasificación por escalas de desarrollo gonadal en hembras empleada en este trabajo está descrita en la tabla I (Lango-Reynoso *et al.*, 2000).

6.3. Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario (ADNc)

Para los análisis de detección de ESTs en masa visceral por RT-PCR, así como para la cuantificación de vitelogeninas (*Cg-VTG1* y *Cg-VTG2*) por PCR en tiempo real en gónadas y otros tejidos somáticos, se siguió el mismo protocolo de extracción de ARN total y síntesis de ADNc descrito en Fleury *et al.*, (2008). El ARN total extraído de la masa visceral (que incluye tejidos de gónada, glándula digestiva y manto) y de gónada, se purificó mediante el método de extracción por fenol-cloroformo propuesto por Chomczynski y Sacchi (1987), homogenizando los tejidos viscerales de cada organismo en solución de extracción de ARN TRIzol (Invitrogen) ó *Extract-All* (EuroBio, UE) en una proporción 1:5 (tejido/solución de extracción) y purificándolo bajo el protocolo propuesto por el fabricante del reactivo. El ARN total obtenido se cuantificó por espectrofotometría UV. Se tomó 1 µg de ARN total de cada individuo, y se realizó una degradación del ADN genómico residual con ADNasa I (Sigma), en un volumen total de reacción de 10 µl, bajo las condiciones descritas por el fabricante. Del ARN total tratado con ADNasa I, se tomaron 500 ng para la síntesis de ADNc mediante el kit *SuperScript III First Strand Synthesis* (Invitrogen, E.U.) en un volumen total de 20 µl, empleando cebadores oligo-dT18 incluidos en el kit, y siguiendo los protocolos sugeridos por el fabricante.

Para la clonación de los extremos terminales de un EST similar a vitelogenina (*Cg-VTG2*) por el método RACE, se extrajo el ARN total de tres hembras maduras inmediatamente después de la disección, mediante el mismo método descrito anteriormente. El ARN total se cuantificó por espectrofotometría a 280 nm (Nanodrop, Agilent, EU) y la calidad del mismo se verificó para cada individuo empleando un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent EU). Posteriormente se tomó 1 µg de ARN total íntegro para su transcripción reversa con

cebadores oligo-dT y aleatorios ligados a adaptadores específicos del kit comercial SMART RACE cDNA (ClonTech), empleando 200 U de transcriptasa reversa PrimeScript (TaKara, Japón), en un volumen total de 10 µl.

6.4. Identificación de secuencias EST codificantes para posibles vitelogeninas de *C. gigas*

Con el fin de reconocer evidencias de múltiples vitelogeninas transcritas en el ostión japonés, se realizó una búsqueda en bases de datos primarias (GenBank, NCBI; Benson *et al.*, 2008), mediante la cual se identificaron secuencias parciales de ADNc codificante similares a vitelogeninas en otras especies. Los operadores de búsqueda introducidos fueron *vitellogenin* y *yolk protein*, y la búsqueda se delimitó a nivel género *Crassostrea*. La búsqueda incluyó también el escrutinio de una colección de ESTs expresados diferencialmente en glándula digestiva de *C. gigas* (Anguiano-Vega, 2008) en proceso de incorporación a la base de datos GenBank. Las secuencias parciales tipo ESTs obtenidas fueron alineadas con bases de datos primarias de proteínas mediante su traducción conceptual en aminoácidos, mediante el programa en línea BLASTx (Altschul *et al.*, 1997). Se determinó un valor límite de similitud significativa (valor E) menor a 0.001.

A partir de las secuencias encontradas en las bases de datos, que cumplían con los criterios de similitud establecidos, se exploró la existencia de estos mensajeros en el transcriptoma de *C. gigas*, mediante su amplificación por RT-PCR. Se diseñaron primers para ESTs similares a vitelogeninas (David y Moraga, 2005; Anguiano-Vega, 2008), así como para el gen de vitelogenina de *Crassostrea gigas* (acceso GenBank AB084783; Matsumoto *et al.*, 2003) y para el gen de actina de la misma especie (acceso GenBank AF026063) utilizado

como un control positivo de amplificación de mensajero. Este gen codifica para proteínas contráctiles en eucariotas (Cadoret *et al.*, 1999), expresándose de forma basal en los distintos tipos celulares de metazoarios, y ha sido empleado en otros trabajos como un gen constitutivo en el ostión japonés (Huvet *et al.*, 2003). Los cebadores fueron diseñados con el software primer3 (Rozen y Skaletsky, 2000), y las secuencias se detallan en la tabla II.

Tabla II. Lista de cebadores diseñados para la amplificación por RT-PCR de ESTs similares a vitelogeninas (EST 1 y 2), vitelogenina de *C. gigas* y gene de actina.. Las referencias indican los trabajos donde se detalla la caracterización de los mensajeros correspondientes.

Fragmento EST	Ubicación de secuencia en bases de datos	Secuencia de cebadores diseñados
EST 1 similar a vitelogenina (<i>C. gigas</i>)	genoteca de ADNc SSH, (Anguiano-Vega, 2008)	sentido: 5'-CCC AAC ACA AGC GCC TGA TAA AGA ATGC-3' antisentido: 5'-CGC TAG AAT CTG AGG GAA GGC AGT GG-3'
EST 2 similar a vitelogenina (<i>C. gigas</i>)	GenBank CX069172 (David <i>et al.</i> , 2005)	sentido: 5'-TTA GAA GAA CCC GCC CAC ACA AAG GA-3' antisentido: 5'-TCT GCT TGC TGG GCC TTA AGA TCA AGAG-3'
vitelogenina (<i>C. gigas</i>)	GenBank AB084783 (Matsumoto <i>et al.</i> , 2003)	sentido: 5'-GCA ATC CAA ACA ACA ACC AAC CTC-3' antisentido: 5'-TTG ACA GCA ACG TCC ATA TTCA-3
actina (<i>C. gigas</i>)	GenBank AF026063 (Cadoret <i>et al.</i> , 1999)	sentido: 5'-ACG AGG CCC AGA GCA AGA GA-3' antisentido: 5'-GTT GGC CTT GGG GTT GAG TG-3'

Las reacciones de PCR para la detección de los ESTs se realizaron en un volumen final de 20 µl, empleando 10 pmol de cada cebador (tabla II), 1.5 uM de MgCl₂, 200 µM de cada deoxinucleótido, 100 ng de ADNc y 1 U de Taq polimerasa Platinum Hot Start (Invitrogen). La reacción se realizó bajo el siguiente programa de desnaturalización inicial: 94°C 4min; (94°C 30 seg, (T^m - 4°C) 30 seg, 72°C 40 seg) por 30 ciclos. Los productos obtenidos se observaron mediante electroforesis en agarosa al 2%. Los resultados de expresión por RT-PCR se contrastaron individualmente con el análisis histológico (sexo y

estadio de desarrollo gonadal) para establecer la posible participación de cada EST en el proceso de vitelogénesis.

6.5. Identificación del mensajero que incluye un EST similar a vitelogenina por *Northern blot*.

Se realizó una prueba de hibridación en membrana por *Northern blot*, para aproximar la talla y la posible presencia de mensajeros de distintos tamaños conteniendo la secuencia correspondiente al EST 2 (*Cg-VTG2*). Para esto, se preparó una sonda o fragmento de ADN marcado con digoxigenina (DIG), una molécula que es posible detectar específicamente mediante anticuerpos monoclonales (anti-DIG), y cuya secuencia en ácidos nucleicos es complementaria al fragmento del gen objetivo. El principio de detección se basa en la enzima fosfatasa alcalina conjugada a anti-DIG, la que transforma mediante desfosforilación y reducción al complejo 5-Bromo-4-Cloro-3'-Indolifosfato p-Toluidina/cloruro de nitroazul de tetrazolium (BCIP/NBT), generando un precipitado insoluble azul intenso que permanece anclado al soporte (membrana) de forma estable.

La síntesis de sondas de hibridación se realizó en dos pasos, que incluyen la generación de un amplicón correspondiente a la secuencia objetivo y la posterior generación de hebras complementarias marcadas con DIG. Primero, se realizó una RT-PCR a partir de ADNc sintetizado de masa visceral (incluyendo gónada) de tres hembras vitelogénicas, utilizando los cebadores sentido y antisentido para EST2 descritos en la tabla II. El producto de PCR obtenido fue purificado mediante adsorción y elución en columnas de sílica (*QiaKit PCR Purification kit*, Qiagen, EU). Posteriormente, se tomó 3 µg del amplicón purificado y se utilizó como templado para la síntesis de la sonda, empleando el kit *DIG labeling and*

Detection (Roche, Alemania), el cual genera cadenas complementarias a los amplicones de PCR desnaturalizados mediante la enzima polimerasa Klenow-Taq y cebadores de hexanucleótidos aleatorios (*random primers*), intercalando una proporción de deoxinucleótidos de uridina marcados con digoxigenina (dUTP-DIG). El protocolo de reacción empleado fue el que se proporciona por el fabricante del kit, sin realizar modificaciones. Una vez sintetizada la sonda para detectar el EST 2, se procedió a la separación por electroforesis en agarosa en condiciones desnaturalizantes de pools de ARN total de tejidos de masa visceral (gónada, glándula digestiva, manto y tejido conectivo vesicular). Cada pool representa las siguientes condiciones: organismos indiferenciados, hembras vitelogénicas en estadio de maduración-madurez y machos (3 individuos por pool). Se tomaron 3 µg de ARN total de cada pool, y se incubaron en 15 µl de buffer desnaturalizante (buffer de cargado convencional diluido al 50% en formamida desionizada) durante 10 min a 68°C, enfriando en hielo inmediatamente. Posteriormente, las muestras se cargaron en un gel de agarosa al 2% con formaldehído, y se corrieron a 4 Volts/cm y 4°C en buffer TBE-MOPS. El gel fue enjuagado en una solución 0.2X SSC, y fue transferida por capilaridad a una membrana de nylon HyBond+ (Amersham, UK) en buffer SSC 20X por 16 hrs. La membrana fue enjuagada en SSC 5X por 1 min, secada en papel filtro de 3 mm por 30 mins a 60°, y los ácidos nucleicos se ligaron a la membrana mediante secado a 70 °C or dos horas. La membrana fue incubada en solución de hibridación (*DIG labeling and Detection Kit*; Roche, Alemania), conteniendo sonda de hibridación para fragmento EST 2 a una concentración de 150 ng/ml. La hibridación se realizó a 60°C por 16 hrs; posteriormente la membrana fue lavada dos veces en SSC 2X; dos veces en SSC 0.2X, bloqueada en solución de hibridación de bloqueo (proporcionada

por el kit) diluido en buffer de ácido maleico 0.1 M por 30 min. Posteriormente la membrana se incubó en solución de bloqueo con anti-DIG en una concentración de 1 µl de anticuerpo por cada 5 ml de solución de bloqueo, se lavó dos veces en exceso de buffer de ácido maleico + TWEEN 20 0.3% por 5 minutos, y se incubó en solución de revelado Tris 10mM pH 9.6 con sustrato NBT/BCIP hasta observar una banda de reacción. La membrana fué digitalizada mediante un escanner horizontal para documentos.

6.6. Clonación y secuenciación de ADNc del EST 2 (*Cg*-VTG2) por RACE.

La secuenciación de los extremos terminales 5' y 3' del nombrado de aquí en adelante como *Cg*-VTG2, se desarrolló bajo la estrategia RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*). El ADNc preparado para este fin, se diluyó en 100 µl de buffer TE, y se empleó como templado para la amplificación de los extremos 5' y 3'. Para la amplificación del extremo 5', se realizó un PCR conforme al protocolo SMART RACE cDNA (ClonTech) en un vol. final de 25 µl, empleando la enzima polimerasa de alto rendimiento *AccuTaq LA* (Sigma, EU), y empleando como cebador específico 5'-TCT GCT TGC TGG GCC TTA AGA TCA AGA G-3 y los cebadores UPM y NUP. Se realizaron diversos programas de PCR sugeridos en el manual del kit SMART RACE cDNA, modificando los tiempos de extensión y reduciendo la temperatura de hibridación, con el fin de obtener fragmentos específicos.

Para el extremo 3', se realizó la amplificación por PCR empleando un primer específico (5'- TCC GTC ACA GAA CGA TCA CG-3') bajo el siguiente programa: desnaturalización inicial a 96°C por 30min; 30 ciclos a 94°C por 30 seg y 68°C por 2 min; con una extensión final de 8 min a 68°C. El producto de la reacción fué visualizado en

agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, se cortaron los productos obtenidos directamente del gel, y se purificaron mediante el kit *Gel Extraction* (Qiagen, EU). Cada fragmento de DNA fué ligado al vector TOPO pCR2.1 (Invitrogen, EU), clonado en cepas de *E. coli* DH5- α y enviado para la secuenciación de ácidos nucleicos a Cogenix Genome Express; Meylan, Francia.

Las secuencias obtenidas correspondientes a cada fragmento amplificado, fueron revisadas bajo los cromatogramas originales proporcionados por la compañía de secuenciación, y posteriormente alineadas mediante el programa en línea bl2seq (Tatusova y Madden, 1999). Se realizó posteriormente el ensamble de un constructo único de la secuencia de Cg-VTG2 que incluye las secuencias correspondientes al EST CX069172 de Genbank, además de la secuencia adicional de un EST depositado en la base de datos AQUAFIRST (Arnaud Huvet, comunicación personal) y del fragmento 3' obtenido por RACE. Obtenida esta secuencia parcial, se realizó su traducción conceptual en aminoácidos, y se identificó el marco de lectura, el codón de paro de traducción y la señal de poliadenilación. La secuencia de aminoácidos fué analizada en términos de los dominios protéicos para los que pudiera codificar, empleando la herramienta en línea *Conserved Domains* de GenBank (Marchler-Bauer *et al.*, 2005).

6.7. Análisis de expresión cuantitativo de vitelogeninas Cg-VTG1 y Cg-VTG2

6.7.1. Estandarización de PCR tiempo real

La reacción en cadena de la polimerasa, evaluada en tiempo real, permite reconocer de forma sensible la abundancia inicial de una molécula específica de ADN mediante el monitoreo de su curva típica de amplificación exponencial. Esta técnica ha sido

estandarizada exitosamente para el análisis de expresión génica, y constituye una poderosa herramienta de evaluación transcriptómica cuantitativa. En este trabajo, se emplea esta técnica para identificar el sitio de expresión de las vitelogeninas *Cg*-VTG1 y *Cg*-VTG2 en diversos tejidos, así como para conocer el patrón de expresión a lo largo del desarrollo ovogénico y bajo distintas condiciones de maduración.

Como primer paso, se desarrollaron oligonucleótidos para ser empleados como cebadores de reacción. Su diseño se basó en la obtención de un fragmento de 150-200 pb y con una temperatura de alineamiento teórica a 60° C. Las secuencias de los cebadores para amplificación de *Cg*-VTG1 y *Cg*-VTG2, así como para el gene constitutivo *Cg*-EF1- α (Fabioux *et al.*, 2004; Huvet *et al.*, 2004; Fleury *et al.*, 2008) se presentan en la tabla III.

La especificidad de amplificación de cada par de cebadores se comprobó mediante RT-PCR punto final, empleando como templado un pool de ADNc de masa visceral de hembras y machos en gametogénesis activa. La reacción de PCR se realizó en un vol. final de 50 μ l, empleando 20 pmol de cada par primers para real-time PCR (tabla III), 1.5 μ M de MgCl₂, 200 μ M de cada deoxinucleótido, 100 ng de ADNc y 1 U de Taq polimerasa (Qbiogene, Inglaterra). La reacción se realizó en un termociclador convencional bajo el siguiente programa: desnaturalización inicial: 94° 4min; (94° 30s, 60° 30s, 72° 40s) x 35 ciclos.

La amplificación específica de un fragmento de 176 pb se visualizó mediante electroforesis de agarosa al 2%. Una vez comprobada la especificidad de la reacción, se determinó la eficiencia de reacción de amplificación (E) para cada gene, amplificando diluciones seriales del mismo pool de referencia de ADNc empleada para la amplificación específica de cebadores para PCR tiempo real. Las diluciones desarrolladas fueron: 1:5, 1:10, 1:100,

1:1000; 1:10000 en agua destilada. Cada dilución se ensayó por triplicado para cada gen (*Cg-VTG1* y *Cg-VTG2*, *Cg-EF1- α*) y se agregaron pruebas sin ADNc como control negativo. Todas las reacciones de PCR tiempo-real se realizaron en un termociclador de placa horizontal de 96 pozos, marca BioRad LightCycler iQ5 (BioRad, EU).

Tabla III. Secuencias de cebadores empleados para el análisis de expresión por PCR tiempo real.

Gene objetivo	Secuencia
<i>Cg-VTG1</i> (GenBank AB084783)	sentido: 5'-CAGCATCGTTCTCCTTCCA-3' antisentido: 5'-GGTGTCTCTGGGACTGTTGA-3'
<i>Cg-VTG2</i> (GenBank CX069172)	sentido: 5'-AAGTCTACCCCCGTCCGTAT-3' antisentido: 5'-GTTCTGTGACGGAAAGTGA-3'
<i>Cg-EF1α</i> (GenBank AB122066)	sentido: 5'-ACCACCCTGGTGAGATCAAG -3' antisentido: 5'-ACGACGATCGCATTTCTCTT-3'

Las reacciones de PCR tiempo real se prepararon sobre un microplacas ópticas para PCR en tiempo real (Bio-Rad, EU), agregando 5 μ l de cada dilución de ADNc, 3.3 pmol de cada primer, 7.5 μ l de reactivo IQ SYBERgreen supermix (Biorad, EU), en 15 μ l de volumen final. La reacción se realizó en un termociclador con detector de fluorescencia para SYBERgreen iCycler (Biorad, EU), bajo el siguiente programa: 94° 2.5 min; (95° 30 seg, 60° 60 seg) 40 ciclos. Al final del programa de PCR, se determinó la curva de disociación de cada producto en un decremento de temperatura desde 94° hasta 54°, a una tasa de 3° C/min. Esta curva de disociación es necesaria para determinar la ausencia de dimerización de cada par de cebadores en posteriores reacciones de PCR. La eficiencia de amplificación

para cada gen se consideró válida siendo superior a 95%. El valor límite de C_t se ubicó en 100 unidades de fluorescencia.

6.7.2. Análisis cuantitativo de expresión de vitelogeninas Cg -VTG1 y Cg -VTG2 en tejidos somáticos mediante PCR tiempo real.

Se cuantificó la expresión de vitelogeninas Cg -VTG1 y Cg -VTG2 en una serie de tejidos somáticos de machos y hembras vitelogénicas, mediante PCR en tiempo real, con el fin de ubicar posibles sitios de expresión de vitelogeninas alternativos a la gónada. Para esto, se emplearon muestras de ADNc de manto, borde de manto, glándula digestiva, branquias, palpos labiales, músculo liso, músculo estriado, hemocitos, y tejido nervioso del ganglio visceral. Cada muestra consiste en un pool de ADNc sintetizado a partir del ARN total de tres organismos, y se contaron con cuatro muestras de ADNc para cada órgano (12 organismos en total). Las condiciones de amplificación son similares a las empleadas en las reacciones de diluciones seriales, en este caso se fijó la dilución de ADNc en 1:50. Se incluyeron reacciones de amplificación con ARN total tratado con ADNasa I de cada muestra y con cebadores para Cg -EF1- α (control de contaminación por ADN genómico), así como controles negativos y de calibración entre-ensayos para cada par de cebadores.

La expresión relativa se estimó a partir del C_t promedio de triplicado para cada gen objetivo (Cg -VTG1 y Cg -VTG2), normalizando con el valor promedio de C_t del gen referencia (Cg -EF1- α), mediante la fórmula:

$$\text{expresión relativa (UR)} = 2^{-\Delta\Delta[C_t \text{ gen objetivo} - C_t \text{ gen referencia (muestra-calibrador)]}$$

Donde la expresión relativa se expresa en unidades adimensionales (UR) en función a la abundancia del mensajero de referencia (Cg -EF1- α) (Pfaffl, 2001).

6.7.3. Análisis de expresión de vitelogeninas *Cg-VTG1* y *Cg-VTG2* en relación al ciclo ovogénico.

Para el análisis cuantitativo de expresión de vitelogeninas durante el ciclo ovogénico, se emplearon una serie de muestras obtenidas para experimentos de condicionamiento gonádico en laboratorio, como se describe en el apartado dedicado al material biológico. Los análisis de expresión fueron realizados en 17 organismos indiferenciados, 9 machos, 14 hembras en desarrollo inicial de ovogénesis, 10 hembras en estado de maduración, 8 hembras maduras y 6 hembras en estado post-desove. Se realizaron tres réplicas de amplificación por PCR tiempo real para cada gen, para cada organismo, además de controles de contaminación genómica con ARN total tratado con ADNasa I, y controles de calibración para el cálculo de expresión relativa como se describe en el apartado 6.5.2.

6.7.4. Análisis de expresión de vitelogeninas *Cg-VTG1* y *Cg-VTG2* en relación al régimen alimenticio durante la maduración gonadal.

Para valorar el empleo de la expresión de vitelogeninas como marcadores cuantitativos de esfuerzo o inversión reproductiva, se decidió emplear una serie de muestras provenientes de un experimento dedicado a evaluar el efecto del régimen de alimento en la maduración gonadal de los organismos en laboratorio, así como en la expresión de genes como *Cg-TGF- β* y *Og-VASA* (Huvet *et al.*, en preparación). Una vez analizado el estadio de desarrollo gonádico por medio de observación histológica, y asignando las categorías de la escala propuesta por Lango-Reynoso *et al.* (2000) descritos en la tabla I, se eligieron para el análisis de expresión de vitelogeninas únicamente a los organismos hembras correspondientes al estadio de madurez gonadal. Se logró contar con 7 organismos

alimentados en un nivel "bajo" de alimento y 11 organismos en nivel "alto" (12%), todos en un estado de madurez gonadal (ver apartado 6.1, correspondiente a material biológico), a los cuales se procedió a realizar los análisis de expresión de vitelogeninas Cg-VTG1 y Cg-VTG2 bajo los protocolos validados para PCR tiempo real.

6.8. Análisis cualitativo de sitio de expresión de Cg-VTG2 por hibridación *in situ*

Para comprobar los tipos celulares que expresan el mensajero Cg-VTG2, se realizó una técnica histológica basada en hibridación de ácidos nucleicos (ARNm), conocida como hibridación *in situ*. El principio de la técnica es básicamente el mismo al descrito para la hibridación por *Northern blot*; sólo que ahora se realiza directamente en cortes finos de tejido fijados en condiciones libres de ARNasas. Para esto, se prepararon sondas de hibridación marcadas con digoxigenina (DIG) mediante un método de PCR asimétrica. Primeramente, se amplificó por PCR convencional un fragmento de 176 nucleótidos de longitud, empleando los mismos cebadores para el PCR cuantitativo. El producto generado fue diluido 1:10 y se empleó como templado en una reacción de PCR asimétrica, modificando la proporción de cebadores sentido y antisentido a 1:100 para la sonda antisentido y 100:1 para la sonda sentido (control negativo); así como una proporción de nucleótidos dTTP:dUTP-DIG de 3:1. Puesto que la naturaleza de la reacción asimétrica es de incremento lineal, en lugar de exponencial, el rendimiento de producto fue considerado suficiente toda vez que sea capaz de observarse en electroforesis de agarosa con BEt. Debido al aumento de peso molecular por la incorporación de dUTP-DIG, el tamaño del fragmento de ADN en electroforesis aparenta ser mayor al esperado, por lo que se empleó este criterio para determinar la incorporación de DIG. Se generaron dos tipos de sondas en

reacciones separadas, siendo la antisentido la complementaria al ARNm y que efectivamente es capaz de detectar al mensajero de interés. La sonda sentido fue empleada como control negativo de hibridación inespecífica.

Se emplearon una serie de tejidos incluidos en bloques de parafina conservados a 4°C, mismos que fueron fijados en solución de Davidson previo a su inclusión. De cada muestra se contaba con un corte preparado y teñido por hematoxilina-eosina, por lo que únicamente se eligieron 10 muestras representativas de organismos con gónadas indiferenciadas, hembras en estadio de desarrollo inicial y madurez. Los cortes se realizaron a 5 µm de grosor, fueron montados en laminillas adherentes con lisina, y deshidrataron en soluciones seriales de alcoholes. El tejido se permeabilizó con una solución de proteinasa K en PBS (10 µg/ml) durante 30 mins, y se incubó el tejido en solución de hibridación con sonda (solución de Denhardt 1X, 50% formamida, 2x SSC, 10% sulfato de dextrán, 1% BSA, 0.1% de ADN de esperma de salmón, 100 ng/ml de sonda) durante 18 hrs a 42°C. Se realizó una hibridación con sonda sentido en el corte histológico de una hembra madura, para determinar si existe hibridación inespecífica o precipitación indeseable del complejo BCIP/NBT. Todas las muestras fueron hibridadas con sonda antisentido, y se eligió una muestra de hembra vitelagénica para hibridación con sonda sentido (control negativo). Se realizaron lavados de astringencia (2X SSC por 5 min, 0.2X SSC por 15 min) y se bloquearon las laminillas con solución de bloqueo en buffer de ácido maleico por 1 hr. Las laminillas fueron incubadas con Anti-DIG acoplado a fosfatasa alcalina en buffer de ácido maleico pH 7.0, y fueron reveladas en buffer TBS pH 9.5 con sustrato NTB/BCIP hasta observar señal (4-16 hrs). Una vez reveladas, las muestras se contra-tiñeron con el

colorante café de Bismarck (0.2% solución de etanol al 80%), con el objetivo de generar un contraste visual para su observación al microscopio.

6.9. Análisis estadísticos

Las comparaciones de niveles de expresión en unidades relativas de los mensajeros *Cg-VTG1* y *Cg-VTG2* entre tejidos de órganos somáticos, entre estadios de desarrollo gonadal y entre niveles de dieta para maduración gonadal en laboratorio, se realizaron mediante múltiples pruebas pareadas de Kolmogorov-Smirnov (análisis no-paramétrico), empleando la mediana y cuartiles 25%-75% como medidas de tendencia central y de dispersión, respectivamente. El análisis de correlación de expresión de vitelogeninas se realizó con la prueba no-paramétrica por rangos de Spearman. La prueba de influencia de estadio ovogénico en la amplificación del gen constitutivo (*Cg-EF1- α*) se realizó mediante análisis de varianza ANOVA de una vía, empleando los valores de *Ct* corregidos por cada ensayo, Todos estos análisis se realizaron empleando el programa Statistica (StatSoft, EU) versión 6.0.

7. Resultados

7.1. Identificación y ocurrencia de secuencias EST codificantes para posibles vitelogeninas en *C. gigas*

La exploración de bases de datos públicas de ESTs arrojó dos secuencias aisladas de la especie *C. virginica*, así como una secuencia de *C. gigas*; una segunda secuencia para *C. gigas* se encontró en una colección de EST privada. Una de las secuencias EST de 611 pb aislada de *C. virginica* (acceso GenBank CD647526) presenta alta similitud a la vitelogenina reportada para *C. gigas*; con un 83% de identidades positivas en su traducción conceptual en aminoácidos, por lo que se consideró correspondiente a genes ortólogos en ambas especies. La segunda secuencia EST aislada de *C. virginica* (GenBank BG624249) no presenta similitud significativa en su traducción conceptual con alguna proteína relacionada a la familia LLTP (*Large Lipid Transfer Proteins*), por lo que fue descartada para posteriores análisis.

Una de las secuencias aisladas de *Crassostrea gigas* presente en una genoteca de ADNc tipo SSH, reportada por Anguiano-Vega (2008), presentó también una elevada similitud para vitelogeninas tipo B de peces, con 97% de identidades positivas en su traducción conceptual, pero no con vitelogeninas de invertebrados. Sin embargo, no fue posible detectar la presencia de este mensajero por RT-PCR en un pool de ADNc de masa visceral de hembras vitelogenicas, por lo que se consideró como contaminación plasmídica de clonas en el laboratorio (figura 5; carril 1). Por otra parte, la secuencia EST restante aislada de *C. gigas* (nombrada en el apartado de métodos como EST 2), si fue detectada exitosamente mediante RT-PCR en masa visceral de hembras vitelogénicas (Figura 5; carril

2). Esta secuencia fue inicialmente identificada en GenBank bajo el acceso CX069172, 302 nucleótidos de longitud, alineaba adecuadamente con un EST de mayor longitud (667 pb) alojado en la base de datos privada del programa de colaboración europeo AQUAFIRST (<http://aquafirst.vitamib.com>) (A. Huvet, comunicación personal). La traducción conceptual de esta secuencia presenta un alineamiento significativo (valor $E= 4e^{-11}$) al dominio vWD de la vitelogenina de *Haliotis discus* reportada por Matsumoto *et al.*, 2008 (acceso GenBank BAF98238), así como similitudes con vitelogeninas reportadas para insectos y peces. Este fragmento no pudo ser alineado con la secuencia completa reportada previamente para *Crassostrea gigas* (Cg-VTG1; acceso GenBank BAC22716), lo que sugiere que corresponde a una nueva vitelogenina en esta especie, nombrada como Cg-VTG2.

La información de secuencias ESTs similares a vitelogeninas para el género *Crassostrea* se resume en la tabla IV.

Tabla IV. Identificación de ESTs similares a vitelogenina en bases de datos

Especie	tamaño	Base de datos	Cita	Diseño de cebadores y análisis por RT-PCR
<i>C. virginica</i>	611	CD64526	no publicado	NO
<i>C. virginica</i>	968	BG624249	no publicado	NO
<i>C. gigas</i>	310	no registrada	Anguiano-Vega, 2008	SI
<i>C. gigas</i>	302	CX069172	David y Moraga, 2005	SI

El mensajero correspondiente a la secuencia de vitelogenina Cg-VTG1, también fue detectado en ADNc de masa visceral de hembras vitelogénicas (figura 5; carril 3).

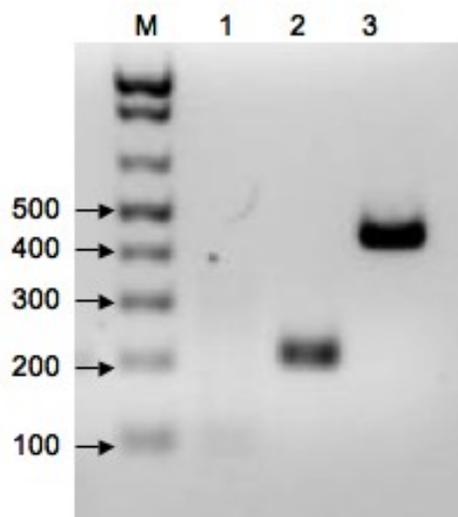


Figura 5. Detección por RT-PCR de fragmentos de supuestas vitelogeninas. M: escalera de DNA (pb). Carril 1: EST similar a vitelogenina aislado por Anguiano-Vega, 2008. Carril 2: EST similar a vitelogenina aislado por David y Moraga, 2005. Carril 3: vitelogenina de *C. gigas* reportada por Matsumoto *et al.*, 2003.

7.2. Detección de EST similar a vitelogenina en distintos estadios del desarrollo ovogenico.

La amplificación en organismos de distintas condiciones gametogénicas (indiferenciados, machos, hembras en desarrollo ovogénico temprano, maduración y de madurez; así como hembras en estado post-desove) muestra que la abundancia relativa del mensajero está en función al sexo y estadio de desarrollo gonadal; expresándose únicamente en hembras en maduración y madurez ovogénica. La expresión en organismos indiferenciados y machos es nula (figura 6).

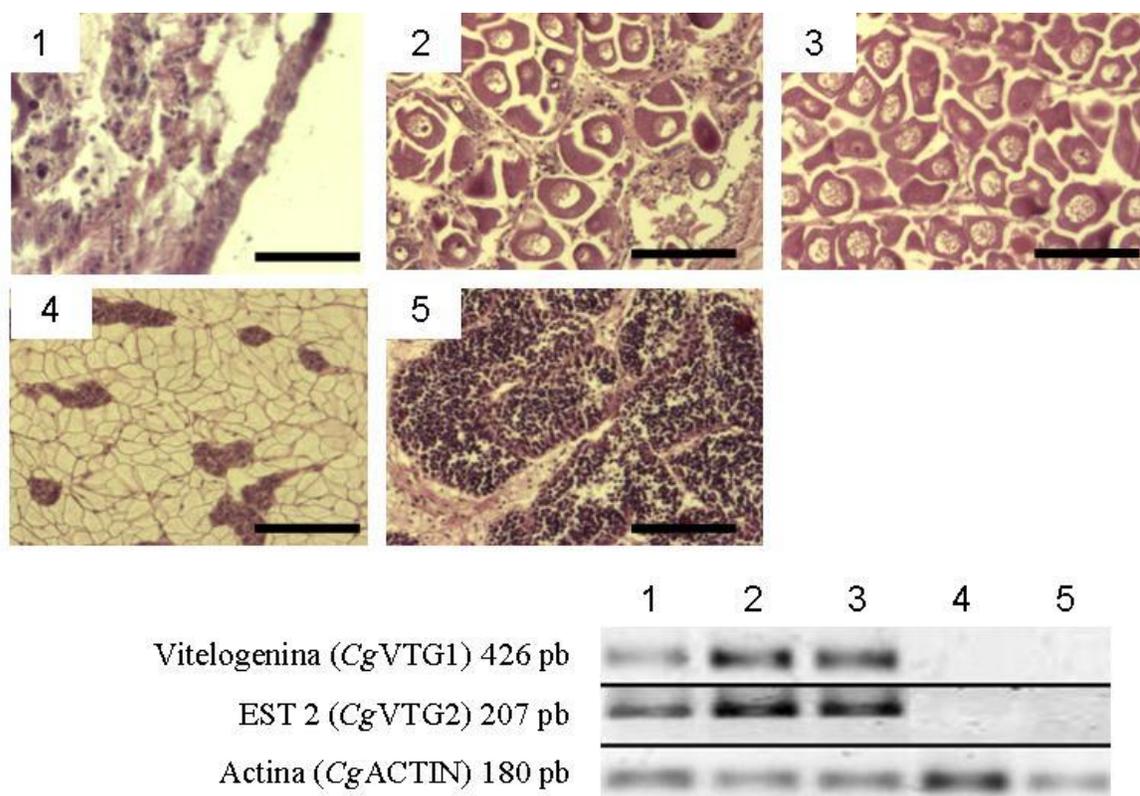


Figura 6. Amplificación por RT-PCR de un fragmento del EST similar a vitelogenina (*Cg*-VTG2), así como de la vitelogenina *Cg*-VTG1 en ADNc de gónadas de hembras en desarrollo temprano (1), maduración (2) y en madurez total (3), así como en un organismo indiferenciado (4) y en un organismo macho (5). Los rasgos histológicos de los mismos individuos analizados se muestran en las fotografías por histología y tinción hematoxilina-eosina. La barra representa 50 µm.

La hibridación por *Northern blot* permitió determinar que el mensajero que contiene al EST 2 (*Cg*-VTG2) aparece como una banda única, con una talla superior a los 5 Kb (determinado por la referencia del ARN ribosomal), y se encuentra presente únicamente en el pool de ARN total de hembras vitelogénicas; no así en machos u organismos indiferenciados (figura 7).

Con estos resultados preliminares, se consideró que el mensajero EST 2, codificaría para una vitelogenina, nombrada como *Cg-VTG2*, por lo que se dirigieron esfuerzos en su caracterización molecular y en su expresión.

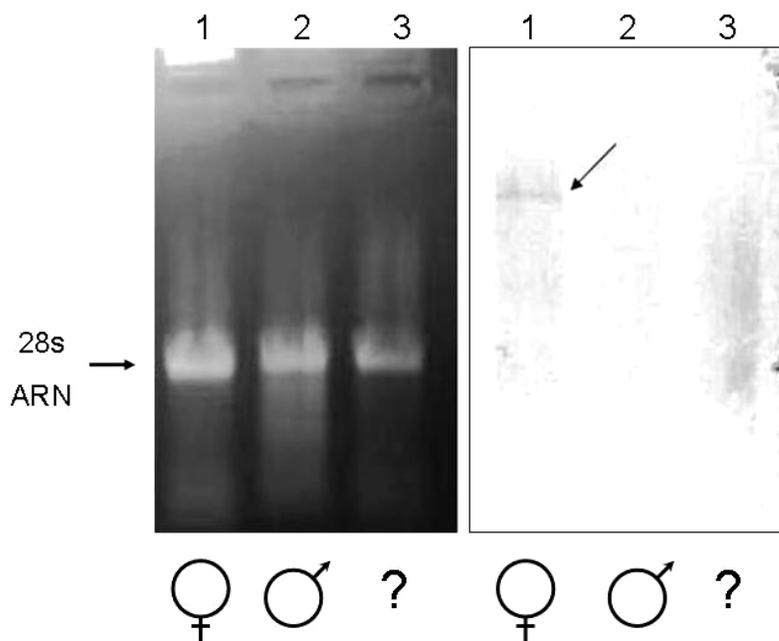


Figura 7. Identificación por *Northern blot* de mensajero que incluye la secuencia del EST (*Cg-VTG2*; acceso GenBank CX069172) en ARN total de gónadas de hembras vitelogénicas (carril 1), machos (carril 2) y organismos indiferenciados (carril 3). A la izquierda, se presenta el ARN total separado en condiciones desnaturalizantes, donde se nota una banda de la subunidad 28s de ARN ribosomal, de aproximadamente 4-6 Kb; a la derecha se presenta la membrana de hibridación revelada, con un fragmento único (flecha) de talla superior al fragmento 28S de ARN ribosomal. Cada carril consiste en un pool de ARN total (3 µg) de 3 organismos en las mismas condiciones gonadales.

7.3. Clonación y secuenciación de ADNc de *Cg-VTG2*

La amplificación del extremo 5' no arrojó resultados positivos; únicamente se observan barridos de baja intensidad en el rango de 500 a 3000 pb (figura 8a). Para el extremo 3' se obtuvieron dos fragmentos de aproximadamente 270 y 260 pb (figura 8). La secuencia de los fragmentos menores contenía parte de la secuencia correspondiente a los cebadores empleados para su amplificación. La secuencias proporcionadas fueron depuradas de

secuencias correspondientes al plásmido de clonación mediante la herramienta en línea *VecScreen* (www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html), y se determinó que ésta es efectivamente un fragmento terminal 3' de ARN mensajero, de 261 pb de longitud, con una secuencia poli-A. Empleando las regiones de empalme entre el fragmento recién secuenciado y la secuencia restante del EST, se realizó un constructo único de 898 pb (figura 9), de los cuales 628 pb corresponden al marco de lectura u ORF y 270 pb de fragmento no traducido o UTR. La traducción conceptual se realizó a partir de la región ORF en el marco de lectura 2+, arrojando una secuencia de 209 aminoácidos (figura 10). La secuencia de aminoácidos así obtenida fué analizada para la búsqueda de dominios proteicos en la herramienta *Conserved Domains* de NCBI (Marchler-Bauer *et al.*, 2005), logrando determinar que una región de 142 aminoácidos codificado en el mismo marco de lectura resulta similar al dominio conservado von Willebrand (vWD), el cual es característico de regiones carboxilo-terminales (correspondientes a extremos 3' de ARNm) de vitelogeninas y otras lipoproteínas de especies de invertebrados y peces. El alineamiento en aminoácidos con la secuencia mas similar encontrada por BLASTx, la vitelogenina de *Haliotis discus hannai* (Acceso GenBank BAF98238; Matsumoto *et al.*, 2008), arroja una similitud de $3e^{-11}$; con 47% de aminoácidos similares y 27% de aminoácidos idénticos (figura 11). En la sección de anexos se presentan alineamientos múltiples con secuencias parciales codificantes para vWD en vitelogeninas representativas de diversos taxa de metazoarios (anexo I), así como un árbol de distancia que refleja la agrupación de dichas secuencias en un contexto filogenético (anexo II).

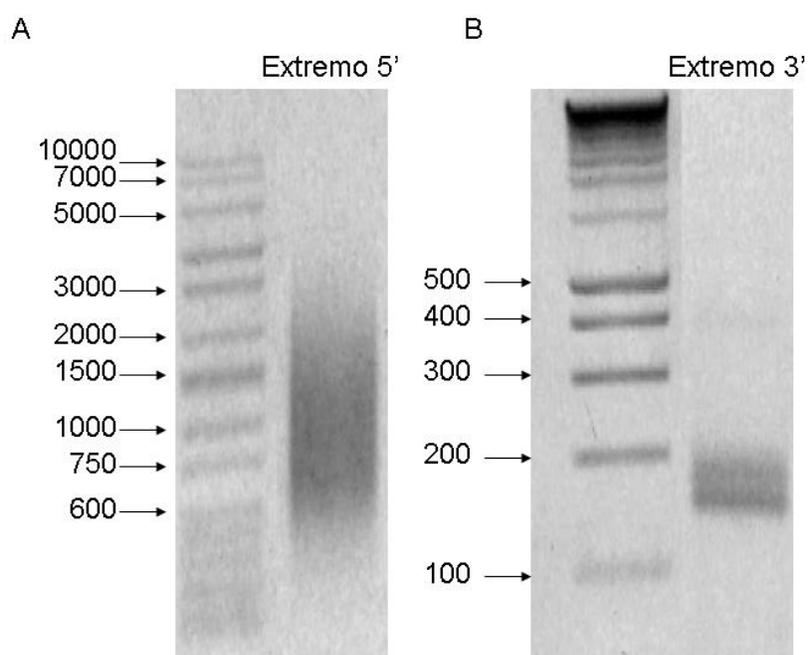


Figura 8. Amplificación RACE de los extremos 5' y 3' del ADNc correspondientes a un EST similar a vitelogenina (*Cg-VTG2*; acceso GenBank CX069172). A: amplificación de extremo 5', donde no se logró obtener un fragmento específico. B: amplificación de extremo 3', donde se obtienen dos fragmentos, de entre 260 y 270 pb, los cuales fueron clonados y secuenciados.

>CgVTG2_3'

```

1      ACGACAAGTTCGAGAGGAGTCTTCTATCGCCATCAGGGAGTCCGCTGGCAGTATCCCATC
61     AACTATTAAAGTCAGTCGGAGTCAAAGAATTGTTTCCGTCTTAGCCTCACAAAAGGGTGT
121    TCGTGTGTCTTCTGATGGACGTAAAGTATCTCTCAAGATATCCCCATTCTACTACTCCCA
181    CGTTTGTGGTTTGTGTGGAACTTCGACGGCAAACAAGGAAACGAGTTCCAGAGTCCTAG
241    TAGGACCGATCGCTCAGACTCCAGCTGTCTCGTCTCGATTACCTCGTTCAGATAGCAA
301    ATGTGACTCACAAAGTATCAGAAAGGAGTGTAGCAACCACAGTCTTCCTCGTCTCGATG
361    CCAGCTGGAAAGCAAACCATTAGAAGAACCCGTCTACACAAAGGAGAATCCCAGCTCTG
421    TCTCTCCCAGGAACCCGTGAAGAGCTGTCCGAGTCAGTGTAACCAGTGGACCCAAAGTC
481    TACCCCGTCCGTATGGCTTGTTTCCCTCATGACAGCGCTAAAGCAAAGGAGCTAGAGAG
541    AGATAGCTTCAAGCGCCCTCTTGATCTTATGGCCCAGCAAGCAGACTATACCGAGTATGT
601    CCAGGTTCCAAGGAGCTGTGGAGAAATGTAATCACTTTCCGTACAGAACGATCACGTGC
661    ACGCTGTACAACCTCTGGTGGTGGTACGAGGACTTGTGACATGTAAATAAAGACAGTCCT
721    TACTGGCGGCTTATTCTTCCAAGAAGCGTTTGC GTTGGAAACATAGTCTTGTAATAATTA
781    AATTAGACATTTCGATTATTTTAACAAGTTTATCAGGTTATGTAATTGTATTTTTTTTTT
841    AATAACGAATAAAAATGTGCATGCAGCAGTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Figura 9. Constructo de secuencias correspondientes al extremo 3' del mensajero Cg-VTG2. La región en cursivas representa la secuencia EST encontrada en la base de datos privada AQUAFIRST; y la región subrayada corresponde a la secuencia depositada en GenBank bajo el acceso CX069172. En negritas se señala la secuencia de cebador empleado para la amplificación del extremo 3'; y en sombreado se denota la secuencia correspondiente al extremo 3' amplificada por el método RACE.

```

1  R Q V R E E S S I A I R E S A G S I P S T I K V S R S Q R I
2  CGACAAGTTCGAGAGGAGTCTTCTATCGCCATCAGGGAGTCCGCTGGCAGTATCCCATCAACTATTAAAGTCAGTCGGAGTCAAAGAATT

31  V S V L A S Q K G V R V S S D G R K V S L K I S P F Y Y S H
92  GTTTCCGCTTAGCCTCACAAAAGGGTGTTCGTGTGTCTTCTGATGGACGTAAGTATCTCTCAAGATATCCCCATTCTACTACTCCCAAC

61  V C G L C G N F D G K Q G N E F Q S P S R T D R S D S S C L
182  GTTTGTGGTTTGTGTGAAACTTCGACGGCAAACAAGGAAACGAGTTCAGAGTCTTAGTAGGACCGATCGCTCAGACTCCAGCTGTCTC

91  V L D Y L V P D S K C D S Q S I R K E C Q Q P Q S S S S R C
272  GTCCTCGATTACCTCGTTCAGATAGCAAATGTGACTCACAAAGTATCAGAAAGGAGTGTGACCAACCAAGTCTTCTCTCGTCTCGATGC

121  Q L E S K T I R R T R L H K G E S Q L C L S Q E P V K S C P
362  CAGCTGGAAAGCAAACCAATTAGAAGAACCCTCTACACAAAGGAGAATCCAGCTCTGTCTCTCCAGGAACCCGTGAAGAGCTGTCCG

151  S Q C K P V D P K S T P V R M A C F P H D S A K A K E L E R
452  AGTCAGTGTAAACCAGTGGACCCAAAGTCTACCCCGTCCGATGGCTTGTTCCTCATGACAGCGCTAAAGCAAAGGAGCTAGAGAGA

181  D S F K R P L D L M A Q Q A D Y T E Y V Q V P R S C G E M -
542  GATAGCTTCAAGCGCCCTCTTGATCTTATGGCCAGCAAGCAGACTATACCGAGTATGTCCAGGTTCCAAGGAGCTGTGGAGAAATGTA

632  TCACITTCGTCACAGAACGATCAGTGCACGCTGTACAACCTCTGGTGGTGTACGAGGACTTGTGACATGTAATAAAGACAGTCCCTT

722  ACTGGCGGCTTATTCTTCCAAGAAGCGTTTGGGTTGGAACATAGTCTTGAATAATTAAATTAGACATTTCGCATTATTTTAAACAAGTTT

812  TATCAGGTTATGTAATTGTATTTTTTTTTTAATAACGAATAAAATGTGCATGCAGCAGTGAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Figura 10. Traducción conceptual de la secuencia parcial *Cg*-VTG2. En azul se señala la región de la secuencia que presenta similitud con dominios presentes en vitelogeninas de otras especies; en rojo se indica el codón de paro de traducción.

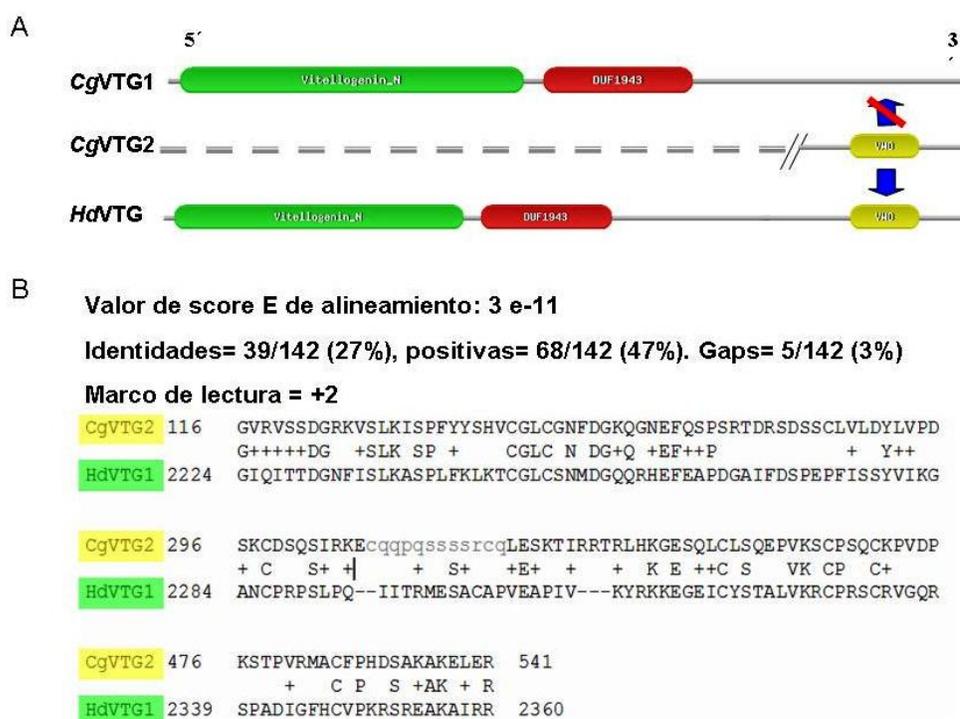


Figura 11. Alineamiento de secuencia *Cg*-VTG2 con vitelogeninas de ostión *Cg*-VTG1 y de abulón *Hd*-VTG. en la figura A (superior) Se presenta a manera de esquema, la región del mensajero donde el alineamiento ocurre con la secuencia de abulón (flecha azul) pero no con la de ostión. Figura B (inferior): alineamiento de secuencias en aminoácidos, representando las identidades positivas (aminoácidos similares) con signo +.

7.4. Análisis de expresión

7.4.1. Estandarización de reacción de PCR en tiempo real

La amplificación de diluciones seriales de ADNc permitió la generación de curvas paralelas para evaluar la eficiencia de amplificación de cada gen, con el fin de conocer el rango de concentración de cDNA dentro del cual la fluorescencia incrementa proporcionalmente en función a la abundancia inicial de templado. Esto también permite la validación del método de cuantificación para futuros análisis, toda vez que los valores de eficacia fueron mayores a 95%. Las curvas de amplificación típica en unidades de fluorescencia fueron normalizadas por el programa controlador del termociclador (iCycler ver. 5.0) con una substracción de la fluorescencia basal (figura 12), y se comprobó de forma empírica que el valor de cruce de 100 unidades de fluorescencia (UF) es adecuado para determinar el inicio de la fase exponencial de la curva de amplificación. Este paso de validación, realizado con diluciones ensayadas de ADNc (1:5, 1:10, 1:100, 1:1,000, 1:10,000), mostraron una adecuada separación, reflejándose en valores de eficacia de 99.8% y 102.2% para *Cg-VTG1* y *Cg-VTG2* respectivamente (Figura 13). El rango dinámico de detección se estima en 3 órdenes de magnitud, lográndose amplificar fragmentos específicos partiendo de diluciones tan bajas como 1:10 hasta diluciones relativamente altas como 1:10,000. A partir de esta gráfica, se determinó la dilución de ADNc 1:50 como apropiada para conducir análisis de PCR cuantitativo.

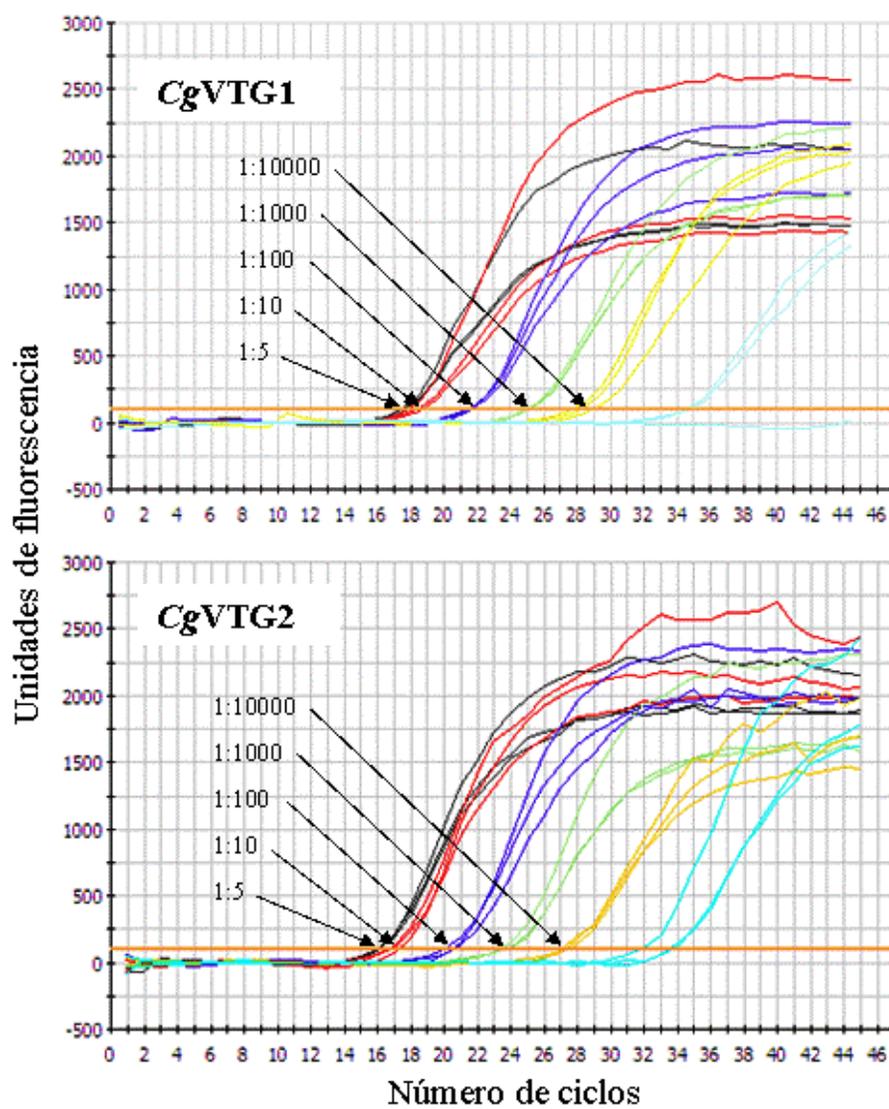


Figura 12. Curvas de amplificación típicas para diluciones seriales de ADNc de gónada de *Crassostrea gigas*, para los genes *Cg-VTG1* y *Cg-VTG2*.

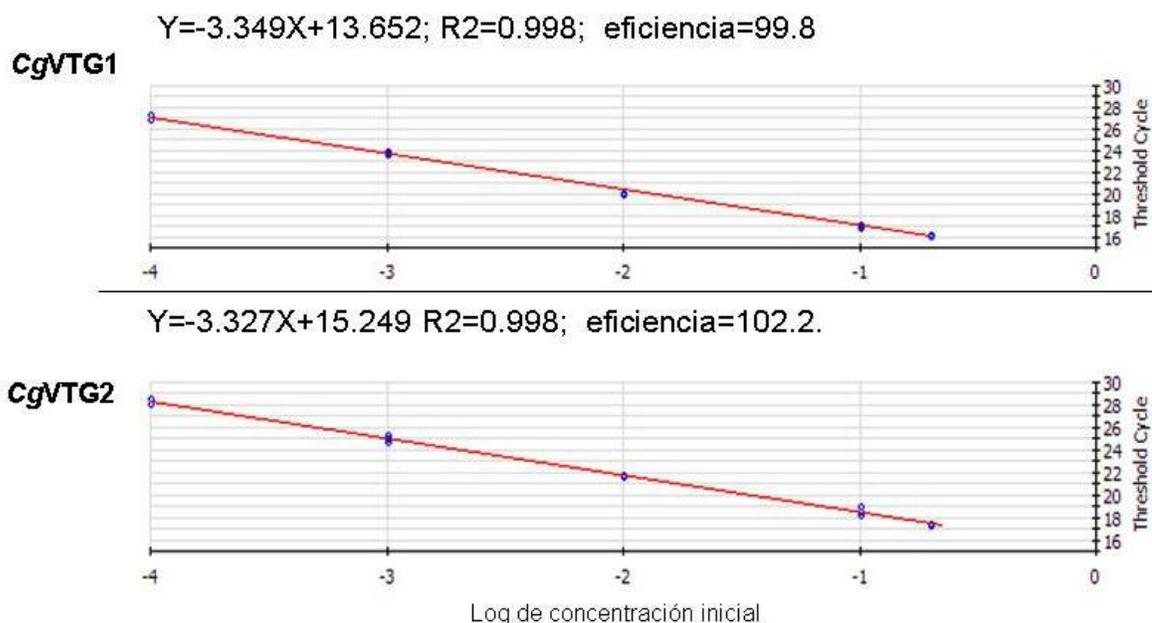


Figura 13. Curvas logarítmicas de eficacia de amplificación a partir de diluciones seriales de ADNc de gónada de *Crassostrea gigas*, para los genes *Cg-VTG1* y *Cg-VTG2*. En las abscisas se representa el C_t , o número de ciclos donde inicia la fase exponencial de reacción; en las ordenadas se representa la dilución, como logaritmo negativo base 10. Los valores de eficiencia de reacción se muestran en la parte superior.

La especificidad de los amplicones obtenidos a distintas diluciones se corroboró mediante las curvas de disociación en un gradiente térmico, mismas que fueron desarrolladas para cada gene evaluado. La temperatura media de disociación para el amplicón correspondiente a *Cg-VTG1* es de 81.5° C, mientras que para *Cg-VTG2* es de 84.5° C (figura 14). No se observó evidencia de dimerización de cada par de cebadores durante la reacción de PCR en diluciones bajas o en reacciones sin ADNc

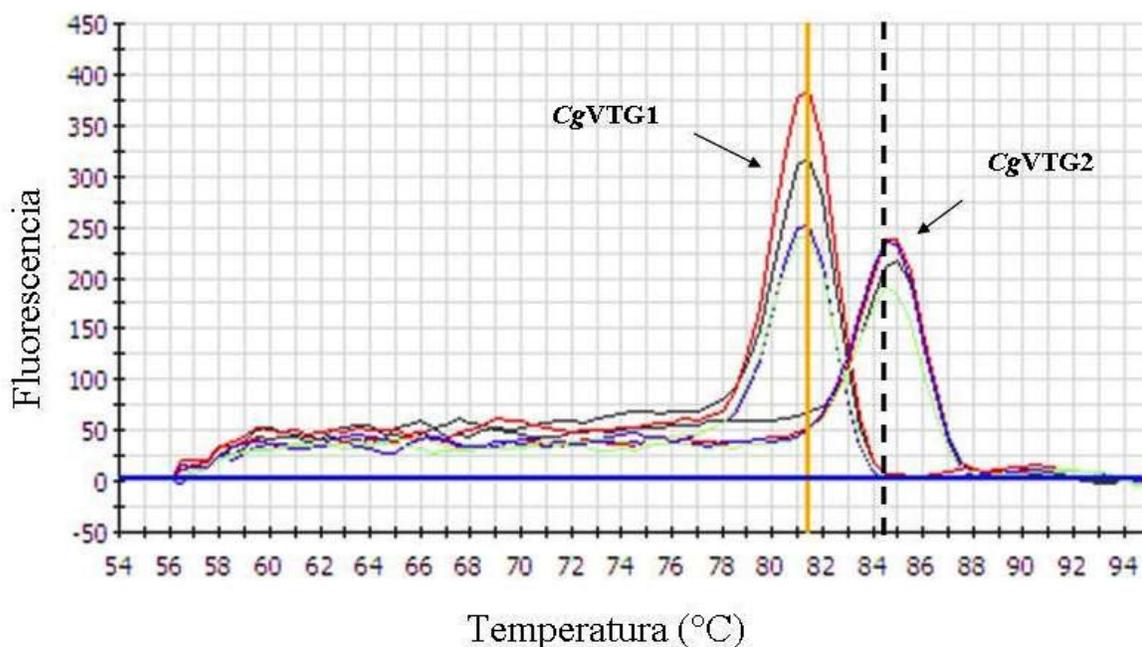


Figura 14. Curva de disociación térmica de amplicones correspondientes a *Cg*-VTG1 (línea continua) y *Cg*-VTG2 (línea punteada) por PCR tiempo real.

7.4.2. Análisis cuantitativo de sitio de expresión por PCR tiempo real

La expresión de ambas vitelogeninas en distintos tejidos somáticos (glándula digestiva, palpos labiales, manto, borde de manto, branquia, músculo liso y estriado, ganglio visceral, hemolinfa) se ubica de tres a cuatro órdenes de magnitud por debajo de la expresión detectada en el pool de ADNc de gónadas en distintos estadios de vitelogénesis, donde la expresión relativa de cada vitelogenina es de $8.4E^{-1}$ UR y $9.1E^{-1}$ UR para *Cg*-VTG1 y *Cg*-VTG2 respectivamente (figura 15). También es posible observar que la expresión en gónada masculina es significativamente menor ($p < 0.001$) a la detectada en gónada femenina. Esta baja expresión en órganos somáticos, en comparación a tejidos germinales propios de gónada femenina, demuestra que éste último órgano representa el principal sitio de expresión de ambas vitelogeninas. No se descarta que la amplia dispersión de los valores de expresión relativa (representados por cuartiles 25-75% y rango de mínimo-máximo)

observado principalmente en glándula digestiva sea consecuencia de contaminación por tejido gonádico al momento de la disección y separación de tejidos.

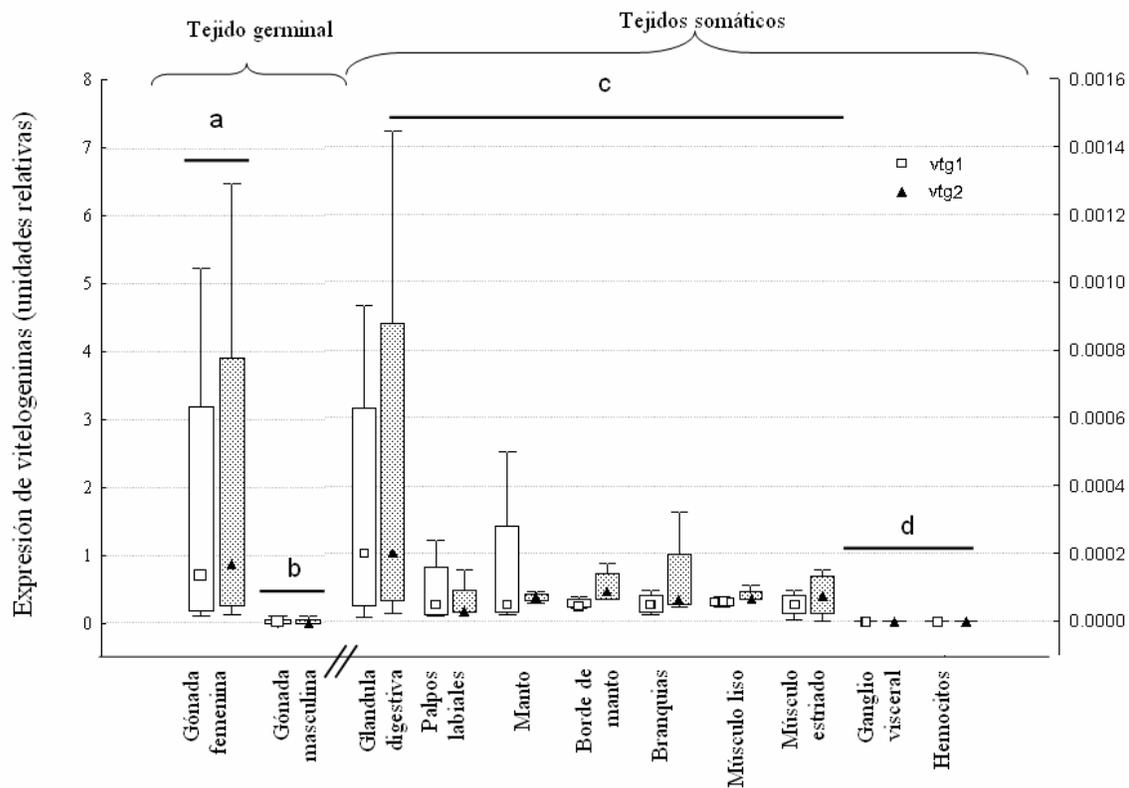


Figura 15. Expresión relativa de *Cg*-VTG 1 y *Cg*-VTG2 evaluada por PCR en tiempo real en distintos tejidos somáticos: glándula digestiva, palpos labiales, manto, borde de manto, branquia, músculo liso, músculo estriado, ganglio visceral, hemocitos. Las unidades son relativas a la expresión del factor de elongación *Cg*-EF1- α . Las letras denotan diferencias significativas ($p < 0.05$) con el resto de órganos. Se representa la mediana (marca), percentiles 25-75% (caja) y valores mínimo-máximo (barras de desviación). La expresión en tejidos somáticos es comparada con la observada en tejido germinales de gónada femenina y masculina (nótese diferencia en escalas para cada tipo de tejido). $n =$ cuatro pools de ADNc; tres individuos por pool.

7.4.3. Análisis cualitativo de sitio de expresión por hibridación *in situ*.

El sitio de expresión del mensajero *Cg*-VTG2 pudo ser localizado mediante hibridación *in situ*. A nivel tisular, se observan señales específicas para la sonda antisentido, que confirma la expresión de *Cg*-VTG2 en gónada, particularmente en células foliculares adyacente a los

ovocitos (figura 16 B y C). Esto se observó en preparaciones histológicas de hembras en estadios de maduración y madurez, donde los acinos están delimitados claramente por membranas basamentales, con células foliculares en su parte interna en estrecha relación a ovocitos en desarrollo (Figura 16 C). No se observó señal de hibridación en tejido conectivo vescicular (TCV; figuras 16 B y C), ni en tejidos de glándula digestiva o manto de los cortes transversales analizados. Tampoco se observó señal de hibridación positiva en células foliculares de preparaciones hibridadas con la sonda sentido (control negativo) (figura D).

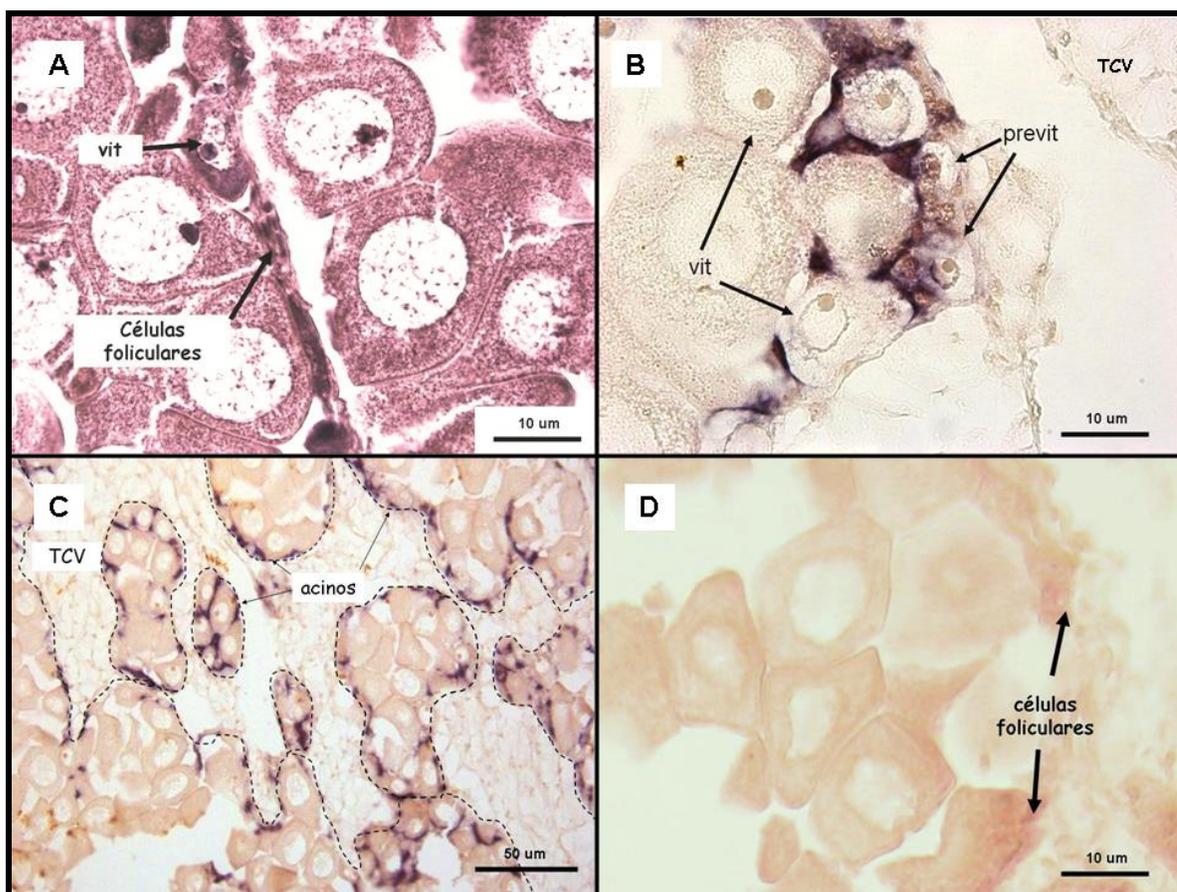


Figura 16. Localización del sitio de expresión de *Cg*-VTG2. A: observación histológica de gónada femenina de *C. gigas*, con tinción hematoxilina-eosina, donde se observan células foliculares en estrecha relación a ovocitos vitelogénicos (vit). B: las células foliculares

presentan reacción de hibridación positiva para el mensajero *Cg*-VTG2. Estas células se encuentran adyacentes a ovocitos previtelogénicos y vitelogénicos, los cuales no presentan expresión de *Cg*-VTG2 (B y C; flechas delgadas). La expresión se restringe a tejido gonadal, células germinales de los márgenes de acinos (delimitados por línea punteada; figura C). D: no se observa señal en hibridación con la sonda sentido en células foliculares (control negativo).

7.4.4. Análisis de expresión cuantitativo de *Cg*-VTG1 y *Cg*-VTG2 en ciclo ovogénico.

La expresión de ambas vitelogeninas fue apenas detectable en estadios de indiferenciación sexual ($2.5e^{-4}$ UR para *Cg*-VTG1; $4.7e^{-4}$ UR para *Cg*-VTG2). En machos, se detectó una muy baja expresión de vitelogeninas ($3.0e^{-4}$ UR para *Cg*-VTG1; $8.0e^{-4}$ para *Cg*-VTG2), pero esta no fue significativamente distinta a gónadas de organismos indiferenciados. Posteriormente se observa un incremento gradual en los estadios de desarrollo temprano ($1.2e^{-2}$ UR para *Cg*-VTG1; $1.4e^{-2}$ para *Cg*-VTG2; $p>0.1$) y maduración ($1.9e^{-1}$ UR para *Cg*-VTG1; $2.5e^{-1}$ para *Cg*-VTG2) hasta encontrar la mayor expresión en el estadio de madurez (6.5 UR para *Cg*-VTG1; 6.1 UR para *Cg*-VTG2). El incremento de expresión en el estadio de madurez, en comparación al estadio de desarrollo temprano, es de 550 y 430 veces para *Cg*-VTG1 y *Cg*-VTG2 respectivamente. En el estadio post-desove o degeneración se observa un decremento en la expresión de ambas vitelogeninas, ($9.3e^{-2}$ U.R para *Cg*-VTG1; $2.0e^{-1}$ U.R. para *Cg*-VTG2) hasta alcanzar niveles de expresión similares a los estadios de desarrollo temprano y maduración ($p>0.1$ para ambos genes (figura 17). No se observó una respuesta en la amplificación de *Cg*-EF1- α en función al estadio reproductivo (ANOVA una vía, $p=0.0682$, $\alpha=0.05$), siendo el coeficiente de variación para los valores *Ct* de 5.9%. Las diferencias estadísticas en la expresión de vitelogeninas entre estadios gondaes fueron idénticas para ambos genes.

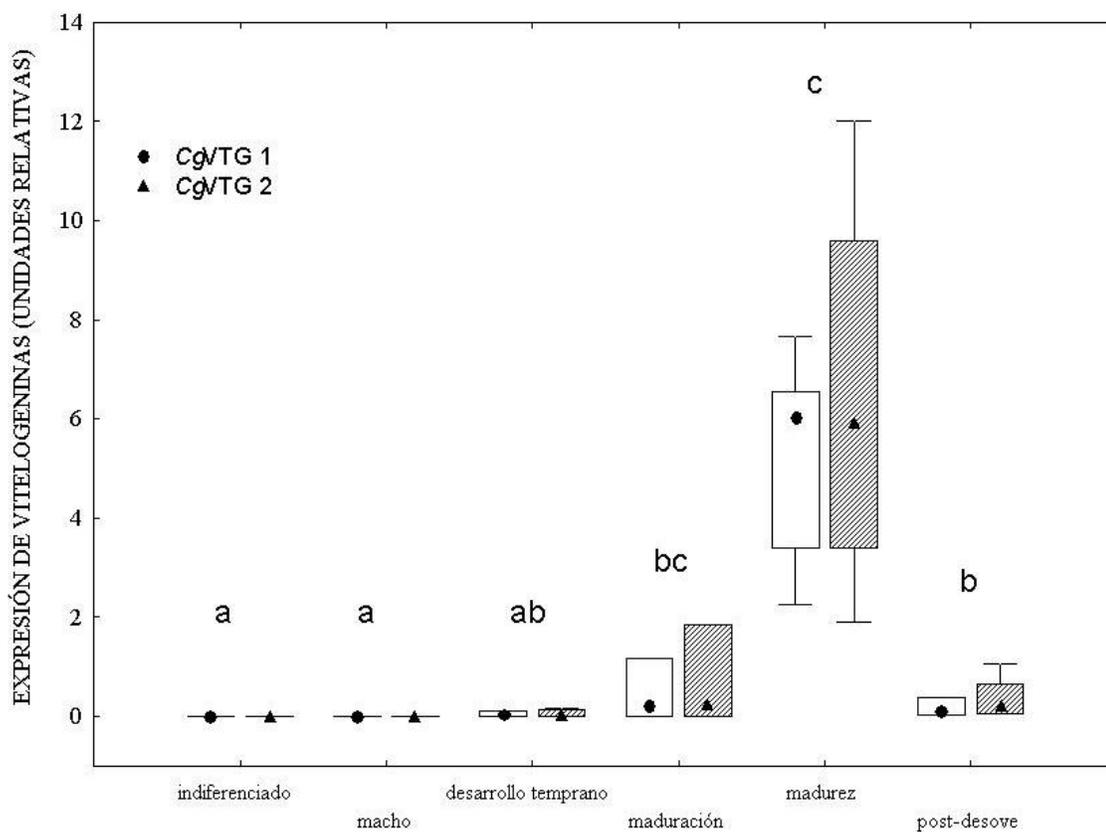


Figura 17. Expresión de *Cg-VTG1* y *Cg-VTG2* (unidades relativas) durante el ciclo ovogénico. Se representa la mediana (punto), percentiles 25-75% (caja) y valores mínimo-máximo (barras de desviación). Se analizaron 17 organismos indiferenciados, 9 machos, 14 hembras en desarrollo inicial de ovogénesis, 10 hembras en estado de maduración, 8 hembras maduras y 6 hembras en estado post-desove. Las letras determinan significancias estadísticas por estadio (pruebas de Kolmogorov-Smirnov, significantes con $p < 0.05$)

La correlación en la expresión relativa de ambas vitelogeninas es altamente significativa ($p < 0.001$; $n = 56$), como se observa en la figura 18.

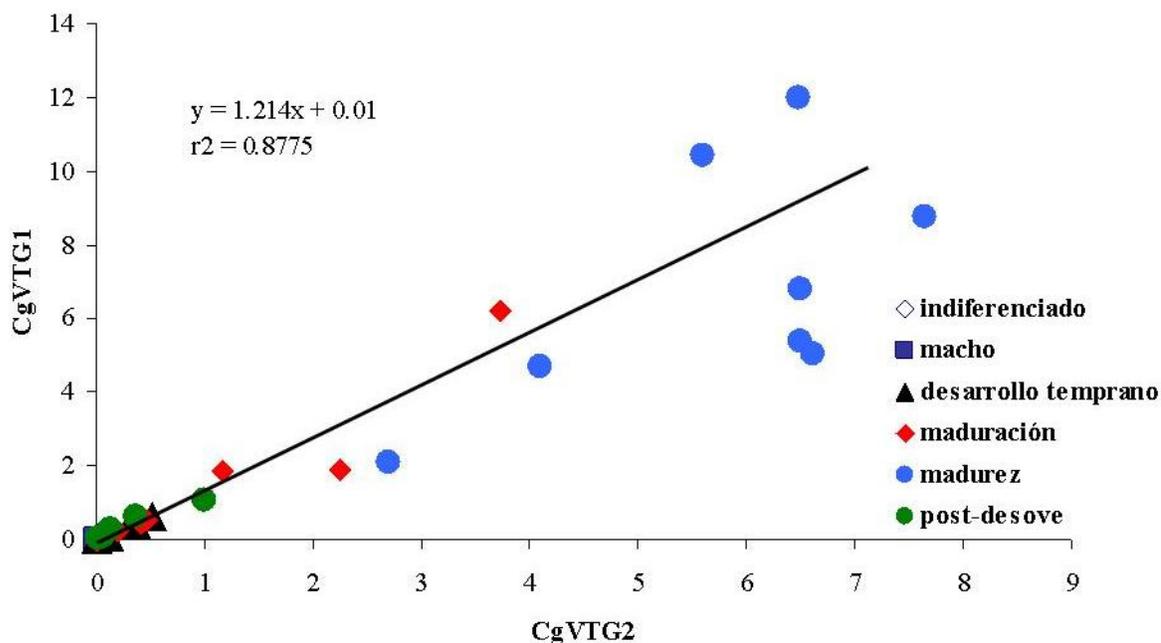


Figura 18. Correlación en la expresión de Cg-VTG1 y Cg-VTG2, con base en unidades relativas de expresión ($p < 0.0001$; $n = 56$).

7.4.5. Efecto del régimen alimenticio durante la maduración gonadal, en los niveles de expresión de vitelogeninas Cg-VTG1 y Cg-VTG2.

Se observó un incremento significativo en la expresión de ambas vitelogeninas ($p < 0.005$) cuando los organismos son alimentados con elevadas cantidades de alimento durante su condicionamiento en laboratorio. Las diferencias son más notables para el gen Cg-VTG2, el cual se sobreexpresa 5.1 veces (9.19 UR para el grupo "alto", contra 1.78 UR para el grupo "bajo"), en comparación a las diferencias observadas en la expresión de Cg-VTG1 (1.88 UR para "alto", contra 6.38×10^{-1} UR para el grupo "bajo"). Ambas pruebas arrojaron valores de significancia $p < 0.005$) (Figura 19)

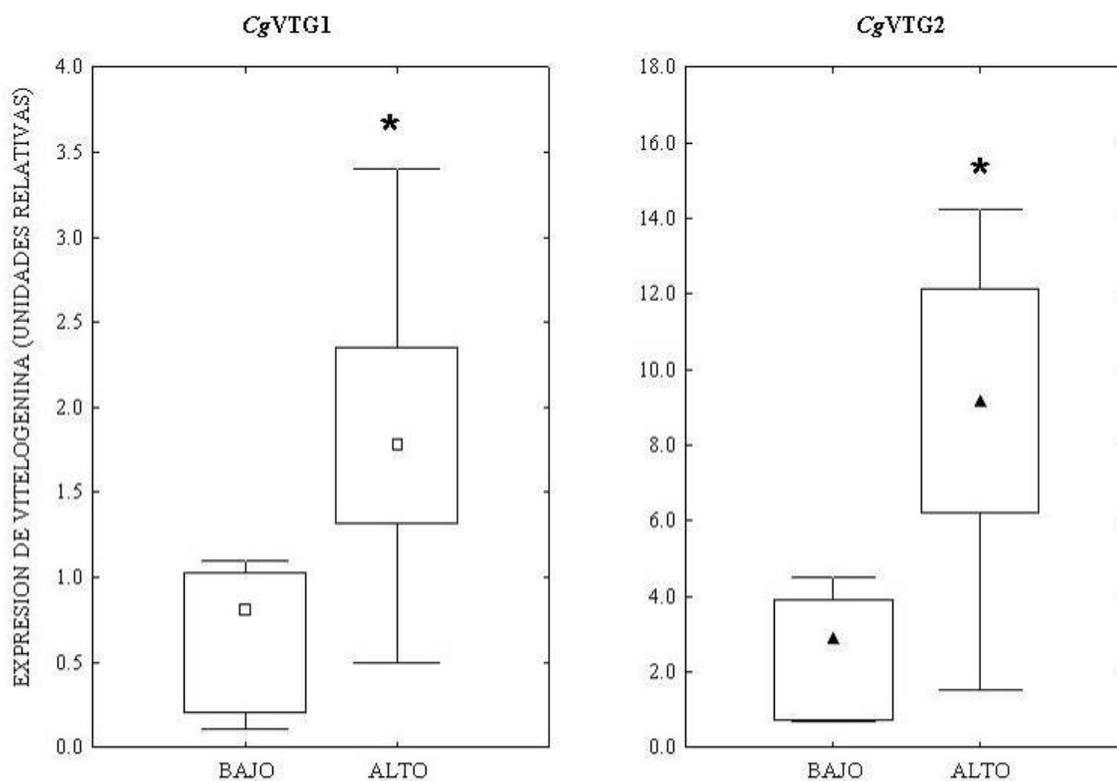


Figura 19. Efecto del régimen alimenticio "bajo" y "alto" durante el acondicionamiento gonadal, en la expresión de vitelogeninas: *Cg*-VTG1(izquierda) y *Cg*-VTG2 (derecha). Los asteriscos representan diferencia significativa ($P < 0.005$). Se expresa la mediana (punto), percentiles 25-75% (caja) y valores mínimo-máximo (barras de desviación). $n=7$ (2%); $n=11$ (12%).

8. Discusión

La vitelogénesis es un proceso central en la reproducción del ostión, ya que provee de materiales nutricios al ovocito para su desarrollo embrionario y larvario (Li *et al.*, 1998b). Sin embargo, el conocimiento relativo a las moléculas que componen el vitelo del ostión es aún fragmentado (Suzuki *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1998^a, 1998b; Matsumoto *et al.*, 2003). Este trabajo se desarrolló con el fin de extender el conocimiento de la diversidad de vitelogeninas presentes en el ostión japonés, *C. gigas*, analizando también los niveles de expresión de estas proteínas durante la ovogénesis e identificando el sitio de expresión. Hasta la fecha, este trabajo sería el primer reporte de múltiples vitelogeninas en una misma especie de bivalvo, siendo relevante ya que esto no se había reportado anteriormente en alguna especie del grupo *lophocotrozoa*, que presenta un rezago importante en cuanto a información genómica disponible en bases de datos públicas (Hedgecock *et al.*, 2005).

8.1. Identificación y ocurrencia de secuencias EST codificantes para posibles vitelogeninas en *C. gigas*

En la primera parte de este trabajo, se presentó la evidencia de existencia de al menos dos mensajeros codificantes para vitelogeninas, basado en análisis de secuencias terminales 3', análisis de RT-PCR y *Northern blot*. Aunque no existen trabajos dedicados a determinar la diversidad de vitelogeninas a nivel genómico en el ostión japonés, existe suficiente evidencia a nivel bioquímico que así lo sugiere. Los precursores macroglobulares de glicoproteínas identificadas por Suzuki *et al.* (1992) en gónada de *C. gigas*, revelan una gama de al menos siete polipéptidos de 105, 85, 66, 64 60 y 45 kDa, que son incorporados en ovocitos vitelogénicos y maduros. El número de subunidades separadas por SDS-PAGE

habla de la compleja naturaleza estructural del vitelo proteico almacenado en los ovocitos del ostión. En otro estudio, Li y colaboradores (1998a) identifican mediante técnicas cromatográficas, un precursor vitélico (vitelina) de 530 kDa en extractos de ovario, cuya concentración se incrementa en organismos colectados durante la temporada de vitelogénesis, y decrece considerablemente durante el período de desove en condiciones silvestres. Al separar esta molécula por SDS-PAGE, se observa que dos bandas mayores de 179 y 110 kDa, así como bandas menores, se relacionan estrechamente al desarrollo de los ovocitos. Estas bandas aparentemente son la principal fuente de aminoácidos durante el desarrollo embrionario y larvario, justo hasta el estadio de larva trocófora, cuando la larva es capaz de incorporar alimento exógeno (Li *et al.*, 1998b), lo que comprueba la importancia de las vitelogeninas como elemento nutricional.

La proteína traducida del mensajero *Cg-VTG1* tiene un tamaño inferido de 179 kDa, con un sitio de digestión por endoproteasas de la familia de las subtilisinas, que resulta en una dimerización hipotética de 94 y 85 kDa (Matsumoto *et al.*, 2003), lo que concuerda parcialmente con las fracciones disociadas por Suzuki *et al.* (1992). Sin embargo, no se ha identificado a nivel molecular el resto de productos proteicos identificados inicialmente por SDS-PAGE. El presente estudio identifica la presencia de un segundo mensajero codificante para una vitelogenina en una misma especie, cuyo producto proteico podría concordar con algunas de las fracciones proteicas identificadas anteriormente por inmunodetección, aunque esto debe ser corroborado mediante análisis similares a los realizados por Matsumoto *et al.* (2003), determinando posibles sitios de digestión por endoproteasas una vez conocida la secuencia completa de ADNc del mensajero.

Por otra parte, la hipótesis de la existencia de diversos mensajeros codificantes para vitelogenina en bivalvos, también se sustenta por la diversificación de genes codificantes para vitelogeninas en diversos taxa estudiados. De hecho, en todos los *phyla* de metazoarios donde existen especies representativas cuyo genoma ha sido secuenciado, se ha reportado la presencia de más de una vitelogenina. El genoma del nemátodo *Caenorabditis elegans* posee al menos 6 regiones codificantes para vitelogeninas, destacando la presencia de dos pseudogenes no expresados (Spieth *et al.*, 1985; Spieth *et al.*, 1991) como posible resultado de un proceso evolutivo de sub-funcionalización. Para la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, se encuentran depositadas tres secuencias génicas anotadas a partir de su genoma en la base de datos Genbank (Accesos NP511102, NP511103 y NP511148). En crustáceos decápodos, se ha explorado a detalle la presencia de múltiples genes para vitelogeninas, como los reportados para *Metapenaeus ensis* (Tsang *et al.*, 2003; Kung *et al.*, 2004) aunque es necesario señalar que, estudios mas recientes han propuesto que los genes que codifican para las denominadas “vitelogeninas” de crustáceos, presentan una relación evolutiva mas estrecha a la familia de apoproteínas tipo B y lipoporinas (apoB/LpII/I) presentes en vertebrados e insectos respectivamente. Por este hecho, las proteínas precursoras de vitelo en crustáceos conforman un grupo filogenéticamente separado de la familia VTG, recibiendo la nueva denominación de apocrustaceaínas (Avarre *et al.*, 2007).

8.2. Caracterización parcial de secuencia primaria de Cg-VTG2.

La secuencia completa de una proteína puede ser inferida mediante la secuenciación completa del ADNc del ARN mensajero que la codifica. La secuencia completa comprende generalmente desde un fragmento 5'-terminal no traducido (5'-UTR), la ó las regiones

codificantes (ORFs), y una región no transcrita en el extremo 3' (3'-UTR) que generalmente incluye una señal de poliadenilación. Uno de los métodos más empleados para caracterizar la secuencia completa, que incluyan los elementos mencionados de un mensajero, es la técnica *RACE*, la cual requiere al menos del conocimiento de secuencia suficiente para la síntesis de un primer específico. En el caso de la caracterización por *RACE* del mensajero *Cg-VTG2*, sólo se logró identificar una secuencia parcial de 898 pb que se ubica en extremo 3' y que incluye la señal de poliadenilación, así como 270 pb de UTR y 628 pb correspondientes al marco de lectura. Considerando el tamaño relativo de los mensajeros codificantes para vitelogeninas en moluscos (5023 pb para *Cg-VTG1*; 7753 pb para la vitelogenina del gasterópodo *Haliothis discus hannai*) y otros grupos de invertebrados, la secuencia parcial de *Cg-VTG2* podría contener alrededor de 10% de la secuencia completa. El gran tamaño del mensajero, mayor a la talla del ARN ribosomal que es de aproximadamente 4-6 Kb, se corroboró por hibridación en membrana de ARN total separado en electroforesis desnaturizante (*Northern blot*), aunque no se contó en dicho ensayo con un marcador de peso molecular para determinarla con precisión. La notable longitud inferida del extremo restante a la secuencia parcial, explica la dificultad de obtener mediante el método de *RACE* la secuencia 5' de este mensajero relativamente largo, sobre todo cuando la secuencia conocida se ubica justo en el extremo 3'. De hecho, se ha documentado en la literatura técnica de los diferentes kits comerciales para la amplificación por el método de *RACE*, que la enzima transcriptasa reversa empleada en la síntesis de ADNc posee una procesividad limitada en ciertos mensajeros largos y con estructuras secundarias complejas. De hecho, esta técnica fue desarrollada en un principio para la clonación completa de genes de tamaño promedio de 2.4 Kb, donde sólo el 44% de los

mensajeros mayores a 4 Kb son clonados de forma intacta (Zhu *et al.*, 2001), aunque se han venido desarrollado optimizaciones a la técnica que han permitido amplificaciones de mensajeros de gran tamaño. Sin embargo, aún produciendo cierta proporción de ADNc completo, la posible presencia de fragmentos truncados producto de una transcripción reversa incompleta, podrían ser la causa de obtener fragmentos pequeños y "barridos" en la reacción de PCR enunciado posteriormente en el protocolo. Por otro lado, el empleo de técnicas distintas a la amplificación por RACE para poder caracterizar la secuencia completa podría ser un recurso alternativo. La generación y escrutinio de genotecas de ADNc con marco de lectura completos para la caracterización completa de *Cg*-VTG2, empleando fagos o levaduras como vectores de clonación, es una alternativa viable; así se ha caracterizado genes relacionados a procesos reproductivos en gónada del ostión japonés, pertenecientes a la familia TGF (Lelong *et al.*, 2000; Fleury *et al.*, 2008). Este tipo de genotecas son tejido-específicas, y hasta la fecha no hay publicaciones que reporten genotecas sintetizadas a partir de tejidos de gónada de ostión japonés, que pudieran ser útiles en la caracterización de secuencias de vitelogeninas y otras moléculas implicadas en procesos reproductivos de *C. gigas*. Otra herramienta alternativa que elimina la limitación de la transcripción reversa para la amplificación de mensajeros complejos, es el escrutinio de genotecas genómicas tipo BAC (*Bacterial Artificial Chromosomes*). Esta estrategia se ha empleado exitosamente para la caracterización de los genes codificantes para vitelogeninas en el crustáceo *Metapenaeus ensis* (Tsang *et al.*, 2003). Con esta técnica es posible incluso caracterizar la estructura del gene para conocer las regiones intrónicas (codificantes) y exónicas, así como los sitios promotores y elementos reguladores que, alenando con la secuencia de ADNc correspondiente, establece información incluso de las

regiones genómicas implicadas en los mecanismos de expresión y regulación transcripcional vía *splicing* alternativo. En el caso del ostión japonés, la disponibilidad comercial de genoteca tipo BAC en distintos formatos (membranas, clonas individuales y en pools) permiten a la comunidad científica incorporar esta herramienta genómica (Cunningham *et al.*, 2006).

Como se mencionó anteriormente, la diferencia de ambos mensajeros codificantes para vitelogeninas a nivel de su extremo 3'-UTR soporta que ambos mensajeros son codificados por genes distintos, y no por una regulación diferencial *-splicing* alternativo- del mismo gen. Incluso, en otras especies en las que se ha estudiado la ocurrencia de varios mensajeros para vitelogeninas, también se ha demostrado paralogía en los genes que las codifican. En *Metapenaeus ensis*, el resultado de mapeo génico indica que la codificación de los mensajeros ocurre en genes distintos (Tsang *et al.*, 2003). Algo similar ocurre en el nematodo *Caenorabhditis elegans*, donde se identifican las distintas regiones codificantes para vitelogeninas en el genoma completo, ocupando *loci* distintos. En peces, la diversidad de genes de vitelogeninas incluso se explica por procesos de poliploidización y reducción genómica acumulados a lo largo de su historia evolutiva, lo que permite la existencia de duplicaciones en el genoma completo (Finn y Kristoffersen, 2007).

Uno de los aspectos más destacables en la caracterización de la secuencia parcial *Cg*-VTG2 es la presencia de una región codificante para el dominio conservado B del factor von Willebrand (vWD). Este dominio forma parte de una glicoproteína del plasma sanguíneo y participa en la regulación de la hemostasis en el humano (Sadler, 1998). La primer evidencia de la existencia de homología entre una proteína formadora de vitelo y el factor von Willebrand fue reportado por Baker (1988), quien realizó análisis de similitud de

secuencias entre la vitelogenina de *Caenorhabditis elegans* y la secuencia humana del dominio B del vWD. A a partir de este trabajo se ha observado la ocurrencia de este dominio en prácticamente la mayoría de las secuencias de vitelogeninas de otras especies de invertebrados (crustáceos, insectos, nemátodos) y vertebrados (peces, reptiles, aves), así como en apolipoporinas tipo ApoLP II/I de insectos (Smoolenars *et al.*, 2007), aunque existen reportadas al menos dos secuencias de vitelogeninas que carecen del dominio vWD; la vitelogenina 1 (VTG1 o VTGa) del pez zebra *Danio rerio*, así como en la vitelogenina del ostión japonés Cg-VTG1. En el caso de VTG1 del pez zebra, se sugiere que la posesión del dominio vWD juega posiblemente un importante papel funcional, ya que ésta vitelogenina se expresa de 100 a 1000 veces más que el resto de vitelogeninas (VTG2 y VTG3) (Wang *et al.*, 2005). Anteriormente, se había propuesto que el dominio vWD presente en las vitelogeninas podría participar en el libre tránsito de éstas a través del sistema circulatorio sistémico (Chen *et al.*, 1999). Así también, se ha encontrado un patrón de proteólisis diferencial entre aquellas vitelogeninas que carecen del dominio vWD, en comparación con las isoformas que sí lo presentan (Finn, 2002, 2007). Debido a los antecedentes presentados, la presencia diferencial del dominio vWD en las vitelogeninas del ostión Cg-VTG1 y Cg-VTG2, podría sugerir una divergencia funcional de las diferentes vitelogeninas encontradas en el ostión japonés, aunque éstas hipótesis deben ser comprobadas posteriormente.

Previos estudios filogenéticos de las vitelogeninas de invertebrados han ubicado a Cg-VTG1 como un miembro ancestral dentro de la familia de las vitelogeninas, empleando para estos análisis los dominios LLT (*Large Lipid Transfer*) ubicados en el extremo amino terminal (codificados en la región 5' del mensajero) y que es común en todas las familias de

lipoproteínas: vitelogeninas (VTG), apocrustaceaínas (Apc), apolipoporinas II/I (ApoLP II/I), apoproteína humana (ApoB) y proteínas de transferencia mitocondrial (MTP) (Babin *et al.*, 1999), pero la filogenia de la familia de vitelogeninas no presenta relaciones evolutivas claras. Smolenaars *et al.* (2007) suponen que esta discrepancia entre la filogenia de grupos y la topología de árboles filogenéticos de secuencias de vitelogeninas, se debe principalmente a que estos árboles se han generado con un miembro basal de la familia VTG como raíz, en lugar de emplear otro miembro de la superfamilia LLTP que no pertenezca a la familia VTG como miembro externo (*outgroup*) (Smoolenars *et al.*, 2007). Dado que *Cg-VTG2* contiene un dominio común a la familia de las VTG (vWD), no así *Cg-VTG1*, es de esperarse que con la secuencia completa se pudieran realizar nuevos análisis filogenéticos que aclaren o incluso modifiquen la topología basal de los actuales árboles que representan la evolución temprana de la familia.

8.3. Expresión génica de vitelogeninas *Cg-VTG1* y *Cg-VTG2*.

Basados en los resultados de expresión génica cuantitativos en tejidos somáticos, así como en la localización del mensajero mediante hibridación *in situ*, se logró determinar que la gónada es el sitio de expresión de *Cg-VTG2*, particularmente en las células foliculares de los acinos en el ovario. Este resultado concuerda con los obtenidos por Matsumoto *et al.* (2003) para *Cg-VTG1*, quienes identificaron el sitio de expresión de este mensajero también en células foliculares. Osada *et al.* (2004) ubicaron la expresión de vitelogenina en el pectínido *Patinopecten yessoensis* en células auxiliares, las cuales pueden considerarse como análogas a las células foliculares de ostiones. En el abulón *Haliotis discus hannai*, Matsumoto *et al.* (2008) identificaron la expresión de una vitelogenina en células

foliculares. Cabe resaltar que la presencia de células foliculares y análogas (auxiliares) en gónada de varias especies de moluscos bivalvos es común, aunque no se ha determinado con exactitud su importancia en términos de nutrición al ovocito. Estos hallazgos en conjunto remarcan el papel fundamental de las células foliculares en la ovogénesis.

Algunos trabajos clásicos enfocados al estudio de vitelogénesis en moluscos bivalvos ha distinguido la vitelogénesis en este grupo como “solitaria”, considerando que las células foliculares no presentaban un papel importante en el desarrollo de los ovocitos (Raven, 1961). Glastoff (1964) también propone que las células foliculares no participan activamente en la ovogénesis de *C. virginica*, debido a su pequeño tamaño y abundancia. Posteriormente, surgieron estudios que fueron demostrando la importancia de las células foliculares en el desarrollo del ovocito. Pipe (1987) señaló que las células foliculares estudiadas en el mejillón *Mytilus edulis* se encontraban estrechamente relacionadas a los ovocitos en estadios tempranos de desarrollo, demostrando mediante observaciones en microscopía electrónica, las uniones tipo “gap” o desmosomas que existen entre las membranas de ovocitos y células foliculares, así como gránulos electro-densos de lípidos y glucógeno. Las uniones gap aparentemente están involucradas en el transporte de moléculas pequeñas o iones, por lo que la función de las células foliculares en el mejillón podría ser de transporte y biotransformación de reservas. En el pectínido *Pinna nobilis*, Gaulejac *et al.* (1995) concluyeron que las células foliculares participan en procesos de degeneración de ovocitos, seguido de una posible transferencia de precursores proteicos a ovocitos en desarrollo. Dorange y LePennec (1989) atribuyen a las células foliculares, la síntesis *de novo* de la cubierta del ovocito, debido a la extensa presencia de elementos proteosintéticos como un retículo endoplásmico rugoso, mismo que también fue reportado por Suzuki y

colaboradores (1992). Posteriormente otros autores mencionan que las células foliculares del ostión del atlántico, *Crassostrea virginica* no son la principal fuente de vitelo debido a su tamaño y número, incipiente crecimiento en relación a la ovogénesis, así como poca o ninguna actividad endocítica en la interfase ovocito-célula folicular, aunque dada una notable asociación espacial de varias células foliculares por ovocito, es posible que controlen el microambiente alrededor de los ovocitos vía la regulación de iones y moléculas pequeñas. Los mismos autores suponen que el vitelo proteico proviene del tejido conectivo vesicular que rodea los acinos ováricos al menos durante la ovogénesis temprana (Eckerbarger y Davis, 1996). El conjunto de evidencias bioquímicas (Suzuki *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1998a y 1998b; Osada, 2003), así como los reportes de estudios moleculares de expresión génica (Matsumoto *et al.*, 2003; Osada *et al.*, 2004; Matsumoto *et al.*, 2008) y los resultados presentados en este trabajo, demuestran la importancia trófica y/o biosintética de las células foliculares en el desarrollo del ovocito, como principal aportador de material proteico y por el transporte de lípidos relacionado a la naturaleza funcional de todas las vitelogeninas, basados en los análisis de sitio de expresión por hibridación *in situ*, aunque la magnitud energética del componente proteico como fuente nutricia debe ser corroborado más finamente con técnicas bioquímicas cuantitativas.

Existen funciones alternas de las células foliculares sugeridas por otros trabajos. Fleury *et al.* (2008) demuestran que éstas células son el principal sitio de expresión de un mensajero similar a factor de crecimiento específico de gónada, denominado Cg-TGF- β , el cual muestra un patrón de expresión dependiente del estadio de desarrollo gonadal, y cuyo papel fisiológico se encuentra bajo investigación. Los resultados de hibridación *in situ* indican que la transcripción de vitelogeninas Cg-VTG1 y Cg-VTG2 es tejido-específica, y los

análisis cuantitativos por PCR tiempo real indican que existe expresión basal en tejidos de otros órganos. La expresión basal en tejidos extra-ováricos es notablemente reducida en comparación la expresión en ovario, de 3 a 5 órdenes de magnitud por debajo al nivel de expresión encontrado en gónadas de hembras vitelogénicas. Boutet *et al.* (2008) reportan una aparente expresión nula en tejidos somáticos de un EST similar a VTG en *Argopecten purpuratus*. La persistencia de una expresión basal en tejidos extra-ováricos observada en ostión japonés (este estudio), puede ser explicada mediante un mecanismo de “expresión ilegítima”, descrito por Chelly *et al.* (1989), y que podría relacionarse con la regulación negativa o silenciamiento génico (Niu, 2005).

El patrón de expresión durante un ciclo vitelogénico completo muestra un incremento progresivo de la expresión de ambas vitelogeninas en función directa al avance gonádico hasta el estadio de madurez, donde se observan los mayores valores de expresión. Estos resultados sugieren que la fase tardía de la vitelogénesis, donde la mayoría de células germinales están completamente maduras, marca el período de máxima expresión e incorporación de vitelogeninas, lo que concuerda con lo establecido por Ravin (1961) de que la vitelogénesis proteica ocurre posterior a la vitelogénesis lipídica. Mediante la técnica de hibridación *in situ*, fue posible observar una intensidad mayor de la señal enzimática en aquellas muestras de hembras maduras, en contraste con las muestras de hembras en desarrollo temprano. Sin embargo, esta afirmación no debe considerarse concluyente, ya que la aproximación por hibridación *in situ* es únicamente cualitativa.

El papel de la vitelogenina como material de reserva total del ovocito maduro es de dos tipos: transporta lípidos, pigmentos, carbohidratos y moléculas de alta energía hacia el ovocito, y provee aminoácidos propios de su estructura necesarios para la síntesis *de novo*

de proteínas en el embrión en desarrollo. Sin embargo, el contenido de lípidos en la estructura funcional de la vitelogenina es bajo, siendo del 8 al 15% en el insecto *Manduca sexta* (Ziegler y van Antwerpen, 2006) y de 13-16% en las vitelogeninas del pez *Gambusia affinis* (Sawaguchi *et al.*, 2005). Por otra parte, el elevado contenido de proteínas en el ovocito maduro del ostión (40-50% en peso), así como el contenido de lípidos (14-16%) (Lee y Heffernan, 1991), podrían indicar que existen otros procesos de transporte e incorporación de lípidos en ovocitos además de las vitelogeninas. En modelos de desarrollo ovogénico más estudiados, como el de los insectos, se han reconocido mecanismos de transporte de lípidos en hemolinfa por apoproteínas, y que movilizan principalmente ácidos grasos libres, acilglicéridos y fosfolípidos, los cuales son acarreados en su forma libre por proteínas transportadoras de membrana hacia el interior del ovocito (Ziegler y van Antwerpen, 2006). En el ostión no se conocen mecanismos alternativos para la incorporación de lípidos en ovocitos similares a los estudiados en insectos, pero sí se han descrito una serie de complejos macromoleculares de transporte lipídico en hemolinfa, similares a los observados en insectos, que va desde las lipoproteínas de muy baja densidad, a lipoproteínas de muy alta densidad, con composición variable de clase de lípidos (Allen y Conley, 1981), que podrían estar transportando la mayor parte del componente lipídico del ovocito incorporado durante la vitelogénesis temprana.

En el análisis de expresión de vitelogeninas en distintos estadios de ovogénesis, también se observa un decremento significativo en aquellos organismos en estadio de post-desove en comparación con las hembras maduras, similar al rango de expresión cuantificado para los organismos en estadio de desarrollo temprano. Esto es explicado por la presencia de ovogonias previtelogénicas en proliferación en inicio de vitelogénesis en cortes

histológicos de hembras en este estadio de post-desove, lo cual es indicador de un proceso de reinicio ovogénico. El reinicio ovogénico ha sido descrito en el ostión japonés, incluso en zonas templadas (Lango-Reynoso *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2003), donde la dinámica estacional tiende a formar picos reproductivos en ciertos meses del año. La expresión de vitelogeninas en hembras post-desove también ha sido observado en el decápodo *Marsopenaeus japonicus*, donde la expresión de vitelogenina alcanza el mayor nivel en los estadios de madurez, y decrece significativamente en gónada y hepatopáncreas posterior a la ovoposición o desove (Okumura, 2007). Así también, se observa una gran variabilidad en la expresión de vitelogeninas en estadios de maduración y madurez, mismo que puede explicarse bajo distintas perspectivas. La primera de ellas es la importante variación relacionada a la maduración gonadal, tanto asociada a factores ambientales como a características genéticas, que pueden reflejarse en la respuesta diferencial de transcripción y síntesis de moléculas de reservas energéticas destinadas para los ovocitos. La influencia de factores ambientales (Chavez-Villalba *et al.* 2002), y el componente genético (Samain *et al.*, 2007) han sido documentados como factores de variación relacionados al esfuerzo reproductivo. La segunda perspectiva bajo la cual se explica la alta variabilidad de expresión en vitelogeninas se refleja en la asincronicidad en el avance ovogénico dentro de la unidad funcional (acino) del ovario del ostión. En un mismo acino de un organismo en maduración, es posible encontrar gametos en distintos estadios de ovogénesis: ovogonias recién diferenciadas por mitosis en previtelogénesis, ovocitos en intensa actividad vitelogénica y ovocitos maduros pedunculados y libres en el centro del acino. Así también, es posible observar regiones de la gónada donde los acinos se encuentran en desarrollo inicial con alta proporción de ovogonias previtelogénicas, mientras que en otras regiones

los acinos presentan mayor proporción de ovocitos maduros. Una tercera explicación de la alta variabilidad observada en la expresión de vitelogeninas para organismos que se encuentran en el mismo estadio de desarrollo gonadal aparente, surge de los mecanismos de regulación génica, que pudieran tener una influencia diferencial entre organismos, ya que los métodos aplicados en este trabajo se basan en la cuantificación del mensajero y no en la cuantificación de la proteína sintetizada. Esto se observó en crustáceo *Marsupenaeus japonicus*, donde se observan altos niveles de transcritos de VTG durante la vitelogénesis tardía y desove, aún cuando los niveles de la proteína vitelogenina en hemolinfa decrece significativamente debido a que es secuestrada por los ovocitos (Okumura *et al.*, 2007).

La similitud en los niveles de transcritos de ambas vitelogeninas, *Cg*-VTG1 y *Cg*-VTG2, denotados por un valor de correlación altamente significativo, sugiere que los mecanismos de regulación de ambos mensajeros (o genes) son muy conservados entre sí. Esto contrasta con la información obtenida en otras especies, donde las isoformas de vitelogenina específicas de ovario y hepatopáncreas (peneidos) o hígado (peces) se expresan en períodos distintos del desarrollo ovogénico (Tsang *et al.* 2003, Wang *et al.* 2005, Okumura *et al.* 2007). Los niveles relativos de mensajeros *Cg*-VTG1 y *Cg*-VTG2 reportados en este trabajo ocurren dentro del mismo orden de magnitud. En contraste, Wang *et al.* (2005) reporta variaciones de hasta 3 órdenes de magnitud en la expresión de distintas vitelogeninas del decápodo *Metapenaeus ensis*, y en el pex *Verasper mosseri*, los niveles de mensajero de VTG1 y VTG2 superan en 1000 y 100 veces al mensajero VTG3, respectivamente (Wang *et al.*, 2005)

Las escalas de desarrollo gonadal generalmente empleadas para valorar el avance ovogénico en ostiones, han sido desarrolladas con base en distintas características

citológicas. Pueden ser de tipo cualitativo, donde se determinan previamente estadios de desarrollo en función a características comunes del tipo de gametos presentes y su proporción relativa, además del área de cobertura de la gónada con respecto al tejido vesicular estimado de forma empírica. Recientemente, se han desarrollado métodos cuantitativos que estiman el diámetro promedio de los ovocitos y asignándolos a una clase modal; este análisis prosigue mediante la comparación de la proporción de ovocitos por clase modal (Lango-Reynoso *et al.*, 2000). Recientemente, se desarrolló un método cuantitativo enfocado a analizar el esfuerzo reproductivo del ostión japonés, mediante la detección por ELISA de proteínas específicas de vitelo, empleando anticuerpos policlonales específicos (Kang *et al.*, 2003). En este trabajo, se pretende proponer valorar el análisis de expresión de vitelogeninas como marcadores cuantitativos de esfuerzo reproductivo a nivel molecular, analizando el efecto de la cantidad del alimento durante el condicionamiento gonadal en la expresión de vitelogeninas *Cg-VTG1* y *Cg-VTG2*. Es bien conocido que la condición trófica promueve la maduración gonadal (Chávez-Villalba *et al.*, 2002; Cannuel *et al.*, 2005), y se ha detectado la influencia de esta variable en la expresión de ciertos genes relacionados a la reproducción, como el *Cg-TGF-β* (Fleury *et al.*, no publicado). En este trabajo se decidió analizar la expresión relativa de vitelogeninas únicamente en aquellas muestras que se encuentran en el mismo estadio de maduración (estadio de madurez), con el objetivo de determinar si es posible identificar diferencias significativas a nivel expresión de precursores vitélicos independientemente del estadio de desarrollo por histología. Se encontró que existe un incremento significativo en la expresión de ambas vitelogeninas en los grupos experimentales, alimentados durante 60 días con cantidades altas de alimento, en comparación al grupo alimentado con cantidades bajas (12% contra 2% del peso seco de

organismo en peso seco de algas por día). Esta expresión diferencial de vitelogeninas entre regímenes alimenticios podría tener implicaciones en la calidad de los gametos y viabilidad larvaria debido a que en los organismos alimentados con poco alimento se estarían acumulando menos reservas protéicas, aunque éstos deben evaluarse directamente bajo técnicas bioquímicas. Sin embargo es importante resaltar que con estos resultados, se justifica la investigación del esfuerzo reproductivo mediante la expresión de vitelogeninas, en estudios experimentales relativos a la biología reproductiva de la especie, siendo potencialmente aplicable a ensayos de maduración donde el efecto promotor de ovogénesis sea tan pequeño como para ser observado mediante la observación histológica y asignación de estadios reproductivos. Debido a la jerarquía de organización biológica donde se sitúan los procesos de transcripción y de síntesis y acumulación proteica, es importante señalar que el análisis de la expresión de vitelogenina puede indicar efectos a corto plazo (horas) en comparación a la síntesis proteica (horas-días) y su efecto final en el desarrollo gonadal (días-semanas). Esta ventaja es particularmente interesante en estudios básicos del sistema endocrino y del efecto potencial de compuestos endocrino-alterantes, los cuales se podrían realizar en condiciones farmacológicas *in vitro*, y que requieren estrictamente del análisis de respuestas moleculares y celulares cuantitativas, y durante períodos de tiempo relativamente cortos.

9. Conclusiones

Con los resultados presentados a lo largo de este trabajo, es posible determinar que la secuencia parcial del mensajero *Cg*-VTG2 codifica para una vitelogenina paróloga a *Cg*-VTG1, mismas que presentan divergencia funcional derivado en la presencia del dominio vWD, característico de la familia proteica VTG. *Cg*-VTG2 se expresa durante el ciclo ovogénico de *Crassostrea gigas*, con niveles de expresión muy similares a *Cg*-VTG1. Este trabajo es el primer reporte de una segunda vitelogenina en una especie de molusco bivalvo.

Debido a la especificidad y localización de la expresión de *Cg*-VTG2, se denota un importante papel de las células foliculares en la ovogénesis, no sólo como células de transferencia de nutrientes y síntesis de posibles factores de desarrollo y crecimiento celular, sino también como sitio de síntesis de precursores de vitelo en ovocitos en desarrollo.

La expresión de ambas vitelogeninas se ve influenciado por factores externos como la cantidad de alimento, aún cuando los organismos se encuentren en completa madurez gonadal por observación histológica, lo que indica que el análisis expresión de estos genes pueden ser empleados como marcadores a nivel molecular de esfuerzo reproductivo ó avance vitelogénico en estudios fisiológico-reproductivos. Es necesario realizar investigación dirigida a los mecanismos de regulación de este gen, así como su potencial aplicación como biomarcador molecular de desarrollo ovogénico y del efecto de inductores y alteradores endocrinos.

10. Literatura citada

- Adoutte A, Balavoine G, Lartillot N, Lespinet O, Prud'homme B, de Rosa R (2000) Special Feature: The new animal phylogeny: Reliability and implications. *Proceedings of National Academy of Science* 97: 4453-4456
- Allen WV, Conley H (1982) Transport of lipids in the blood of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Comparative Biochemistry and Physiology B* 71: 201-207
- Anguiano-Vega GA (2008) Desarrollo de biomarcadores de exposición al plaguicida organoclorado lindano (gamma-HCH) en el ostión del Pacífico (*Crassostrea gigas*, Thunberg 1795). Tesis de doctorado en Uso manejo y Preservación de los Recursos Naturales - Orientación Biotecnología., CIBNOR La Paz, BCS.
- Avarre J, Michelis R, Tietz A, Lubzens E (2003) Relationship Between Vitellogenin and Vitellin in a Marine Shrimp (*Penaeus semisulcatus*) and Molecular Characterization of Vitellogenin Complementary DNAs. *Biology of reproduction* 69: 355
- Avarre J, Lubzens E, Babin P (2007) Apolipocrustacein, formerly vitellogenin, is the major egg yolk precursor protein in decapod crustaceans and is homologous to insect apolipoprotein II/I and vertebrate apolipoprotein B. *BMC Evolutionary Biology* 7
- Babin PJ, Bogerd J, Kooiman FP, Van Marrewijk WJA, Van der Horst DJ (1999) Apolipoprotein II/I, apolipoprotein B, vitellogenin, and microsomal triglyceride transfer protein genes are derived from a common ancestor. *Journal of Molecular Evolution* 49: 150-160
- Baker M (1988) Invertebrate vitellogenin is homologous to human von Willebrand factor. *Biochemical Journal* 256: 1059-1061
- Barbosa, V (2004) Detección de agentes virales en el ostión japonés (*Crassostrea gigas*). Tesis de doctorado, Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales -

Orientación Biotecnología., Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz. México. 247 pp.

- Bernay B, Baudy-Floc'h M, Zanuttini B, Zatylny C, Pouvreau S, Henry J (2006) Ovarian and sperm regulatory peptides regulate ovulation in the oyster *Crassostrea gigas*. *Molecular Reproduction and Development* 73: 607-616
- Boutet I, Moraga D, Marinovic L, Obreque J, Chavez- Crooker P (2008) Characterization of reproduction-specific genes in a marine bivalve mollusc: Influence of maturation stage and sex on mRNA expression. *Gene* 407: 130-138
- Caceres-Martinez J, Curiel-Ramírez S, Vasquez-Yeomans R, Montes de Oca P Macia (2004) Reproductive cycle and mortality of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* cultured in Bahía Falsa, Baja California, Mexico. *Journal of Shellfish Research*
- Cadoret JP, Debón R, Cornudella L, Lardans V, Morvan A, Roch P, Boulo V (1999) Transient expression assays with the proximal promoter of a newly characterized actin gene from the oyster *Crassostrea gigas*. *FEBS letters* 460: 81-85.
- Cannuel R, Beninger PG (2005) Is oyster broodstock feeding always necessary? A study using oocyte quality predictors and validators in *Crassostrea gigas*. *Aquatic Living Resources* 18: 35-43
- Chavez-Villalba J (2001) Conditionnement expérimental de l'huître *Crassostrea gigas*. Tesis de doctorado. Especialidad en Oceanografía Biológica. Universidad de Bretagne Occidentale. Brest, Francia. 162 pp.
- Chavez-Villalba J (2002) Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: origin and temperature effect. *Aquaculture* 214: 115-130.
- Chavez-Villalba J (2003) Effects of temperature and feeding regimes on gametogenesis and larval production in the oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Shellfish Research* 22: 721-731.

- Chavez-Villalba J, Villelas-Avila R, Caceres-Martinez C (2007) Reproduction, condition and mortality of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Sonora, Mexico. *Aquaculture Research* 38: 268-278.
- Chen C, Fang JX, Zhu J, Wu JX, Zhang ZC, Gu JX, Wang ZY, Chi CW. (1999) The gene expression of coagulation factor VIII in mammalian cell lines. *Thromb Research* 95: 105-115.
- Cheek AO, Brouwer TH, Carroll S, Manning S, McLachlan JA, Brouwer M (2001) Experimental Evaluation of Vitellogenin as a Predictive Biomarker for Reproductive Disruption. *Environmental Health and Perspectives* 109: 681-690
- Chelly J, Concordet J-P, Kaplan J-C, Kahn A (1989) Illegitimate Transcription: Transcription of Any Gene in Any Cell Type. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86: 2617-2621.
- Chen J-S, Sappington TW, Raikhel AS (1997) Extensive Sequence Conservation Among Insect, Nematode, and Vertebrate Vitellogenins Reveals Ancient Common Ancestry. *Journal of Molecular Evolution* 44: 440-451.
- Chomzynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of total RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162: 156-159.
- Coe W (1943) Sexual differentiation in mollusks. I. Pelecypods. *Quart. Reviews in Biology*. 18: 154-164.
- Cognie B, Haure J, Barillé L (2006) Spatial distribution in a temperate coastal ecosystem of the wild stock of the farmed oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 259: 249-259.
- Colas P, Dubé F (1998) Meiotic maturation in mollusc oocytes. *Seminars in Cell and developmental Biology* 9: 539-548
- Cortes-Guzman AS (1978) Identificación y cuantificación de larvas pediveliger de *Crassostrea corteziensis* Hertlein y balánidos, en el plancton de dos esteros de San

- Blas, Nayarit, Pacífico de México. *Anales del Centro de Ciencias del Mar y Limnología*. UNAM, Mexico.
- Crisp TM, Clegg ED, Cooper RL, Wood WP, Anderson DG, Baetke KP, Hoffman JL, Morrow MS, Rodier DJ, Shaeffer JE, Touart LW, Zeeman MG, Patel YM (1998) Environmental Endocrine Disruption: an effects assessment and analysis. *Environmental Health and Perspectives* 106: 11-56.
- Croll RP, Wang C (2007) Possible roles of sex steroids in the control of reproduction in bivalve molluscs. *Aquaculture* 272: 76-86.
- Cunningham C, Hikima J-I, Jenny M, Chapman R, Fang G-C, Sasaki C, Lundqvist ML, Wing RA, Cupit PM, Gross PS, Warr G, Tomkins JP (2006) New Resources for Marine Genomics: Bacterial Artificial Chromosome Libraries for the Eastern and Pacific Oysters (*Crassostrea virginica* and *C. gigas*). *Marine Biotechnology* 8: 521-533.
- David E, Tanguy A, Pichavant K, Moraga D (2005) Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. *FEBS Journal* 272: 5635-5652.
- Degremont L, Boudry P, Soletchnik P, Bedier E, Ropert M, Samain JF (2005) Effects of age and environment on the summer mortality in cupped oyster *Crassostrea gigas* during the two first years. 97. *Annu. Meeting of the National Shellfisheries Association (Pacific Coast Section) & Pacific Coast Growers Association, of the National Shellfisheries Association*, Philadelphia, Pennsylvania (USA), 10-14 April 2005 24: 650.
- Dorange G, Le Pennec M (1989) Ultrastructural study of oogenesis and oocyte degeneration in *Pecten maximus* from the bay of St. Briec. *Marine Biology* 103: 339-348.
- Eckelbarger KJ, Davis CV (1996) Ultrastructure of the gonad and gametogenesis in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. I. Ovary and oogenesis. *Marine Biology* 127: 79-87

- Fabioux C (2004) Origine et developement des cellules germinales chez l'huitre *Crassostrea gigas*: Intéret pour le controle de la reproduction en ecloserie. Tesis de Doctorado. Universidad de Bretaña Occidental UBO, Brest (France) 219 pp.
- Fabioux C, Huvet A, Lelong C, Robert R, Pouvreau S, Daniel JY, Minguant C, Le Pennec M (2004a) Oyster vasa-like gene as a marker of the germline cell development in *Crassostrea gigas*. *Biochemical and Biophysical Research* 320,2: 592-598.
- Fabioux C, Pouvreau S, Le Poux F, Huvet A (2004b) The oyster vasa-like gene: a specific marker of the germline in *Crassostrea gigas*. *Biochemical and Biophysical Research* 315: 897-904.
- Fabioux C, Huvet A, Le Souchu P, Le Pennec M, Pouvreau S (2005) Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture* 250: 458.
- FAO (2006) Cultured Aquatic Species Information Programme - *Crassostrea gigas*. Text by Helm, M.M. *FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]*. Rome.
- Finn RN (2002) The maturational disassembly and differential proteolysis of paralogous vitellogenins in a marine pelagophil teleost: a conserved mechanism of oocyte hydration. *Biology of Reproduction* 76:936-948.
- Finn RN (2007) Vertebrate Yolk Complexes and the Functional Implications of Phosvitins and Other Subdomains in Vitellogenins. *Biology of Reproduction* 76: 926-935.
- Finn RN, Kristoffersen BA (2007) Vertebrate vitellogenin gene duplication in relation to the "3R hypothesis": Correlation to the pelagic egg and the oceanic radiation of teleosts. *PLoS ONE* 2(1): e169. doi:10.1371/journal.pone.0000169 2.
- Fleury E, Fabioux C, Lelong C, Favrel P, Huvet A (2008) Characterization of a gonad-specific transforming growth factor- β superfamily member differentially expressed during the reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gigas*. *Gene* 410: 187-196.
- Gaulejac B, Henry M, Vicente N (1995) An ultrastructural study of gametogenesis of the marine bivalve *Pinna nobilis* (Linnaeus 1758). I. Oogenesis. *Journal of Molluscan Studies* 61: 375-392.

- Gong N, Yang H, Zhang G, Landau BJ, Guo X (2004) Chromosome inheritance in triploid Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *Heredity* 93: 408-415.
- Guo X, Cooper KR, Hershberger WK, Chew KK (1992) Genetic Consequences of Blocking Polar Body I with Cytochalasin B in Fertilized Eggs of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*: I. Ploidy of Resultant Embryos. *Biological Bulletin* 183: 381-383
- Guo X, Hedgecock D, Hershberger WK, Cooper K, Allen SK, Jr. (1998) Genetic Determinants of Protandric Sex in the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Evolution* 52: 394-402.
- Hayakawa H, Andoh T, Watanabe T (2006) Precursor structure of egg proteins in the coral *Galaxea fascicularis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 344: 173-180.
- Hedgecock D, Gaffney PM, Gouletquer P, Guo X, Reece K, Warr W (2005) The case for sequencing the Pacific oyster genome. *Journal of Shellfish Research* 24: 429-441.
- Hutchinson T (2002) Reproductive and developmental effects of endocrine disrupters in invertebrates: in vitro and in vivo approaches. *Toxicology letters* 131: 75-81.
- Huvet A, Daniel JY, Quere C, Dubois B, Prudence M, Van Wormhoudt A, Sellos D, Samain JF, Moal J (2003) Tissue expression of two α -amylase genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Effects of two different food rations. *Aquaculture* 228: 321-333.
- Iguchi T, Watanabe H, Katzu Y (2006) Application of Ecotoxicogenomics for Studying Endocrine Disruption in Vertebrates and Invertebrates. *Environmental Health Perspectives* 114: 101-105.
- Inoue S, Oshima, I., Nagai, K., Yamamoto, T., Go, J., Kai, N., Honjo, T. (2004) Effect of maternal exposure to tributyltin on reproduction of the pearl oyster (*Pinctada fucata martensii*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 23: 1276-1281.
- Janer G, Porte C (2007) Sex steroids and potential mechanisms of non-genomic endocrine disruption in invertebrates. *Ecotoxicology* V16: 145-160.

- Jenny M, Chapman R, Mancina A, Chen Y, McKillen D, Trent H, Lang P, Escoubas J, Bachere E, Boulo V, Liu Z, Gross P, Cunningham C, Cupit P, Tanguy A, Guo X, Moraga D, Boutet I, Huvet A, De Guise S, Almeida J, Warr G (2007) A cDNA Microarray for *Crassostrea virginica* and *C. gigas*. *Marine Biotechnology* 9: 577-591.
- Jobling S, Casey D, Rodgers-Gray T, Oehlmann J, Shulte-Oehlmann U, Pawlowski S, Baunbeck T, Turner A, Tyler C (2003) Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquatic Toxicology* 65: 205-220.
- Kang S-G, Choi K-S, Bulgakov AA, Kim YK, Kim S-Y (2003) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) used in quantification of reproductive output in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Korea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 282, 1-2: 1-21.
- Kung SY, Chan S-M, Hui JHL, Tsang WS, Mak A, He JG (2004) Vitellogenesis in the Sand Shrimp, *Metapenaeus ensis*: The Contribution from the Hepatopancreas-Specific Vitellogenin Gene (MeVg2). *Biology of Reproduction* 71: 863-870.
- Lango-Reynoso F, Chavez-Villalba J, Cochard JC, Le Pennec M (2000) Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 190: 183-199.
- Lee RF, Heffernan PB (1991) Lipids and proteins in eggs of eastern oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) and northern quahogs, *Mercenaria mercenaria* (Linnaeus, 1758). *Journal of Shellfish Research* 10: 203-206.
- Leffler M, Greer J (1991) The ecology of *Crassostrea gigas* in Australia, New Zealand, France and Washington State. *Maryland Sea Grant College Publisher*. EU. UM-SG-TS-92-07.
- Lelong C, Badariotti F, Le Quere H, Rodet F, Dubos MP, Favrel P (2007) Cg-TGF-[beta], a TGF-[beta]/activin homologue in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*, is involved in immunity against Gram-negative microbial infection. *Developmental and Comparative Immunology* 31: 30-38.

- Li Q, Osada M, Suzuki T, Mori K (1998a) Changes in vitellin during oogenesis and effect of estradiol-17 beta on vitellogenesis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Invertebrate Reproduction and Development* 33: 87-93.
- Li Q, Osada M, Suzuki T, Sato M, Mori K (1998b) Degradation of vitellin during embryonic and larval development in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Invertebrate Reproduction and Development* 33: 1-9.
- Li Q, Osada M, Tahakashi K, Matsutani T, Mori K (1997) Accumulation and Depuration of Tributyltin Oxide and Its Effect on the Fertilization and Embryonic Development in the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 58: 489-496.
- Longo FJ, Mathews L, Hedgecock D (1993) Morphogenesis of Maternal and Paternal Genomes in Fertilized Oyster Eggs (*Crassostrea gigas*): Effects of Cytochalasin B at Different Periods During Meiotic Maturation. *Biological Bulletin* 185: 197-214.
- Marchler-Bauer A, Anderson JB, Cherukuri PF, DeWeese-Scott C, Geer LY, Gwadz M, He S, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke Z, Lanczycki CJ, Liebert CA, Liu C, Lu F, Marchler GH, Mullokandov M, Shoemaker BA, Simonyan V, Song JS, Thiessen PA, Yamashita RA, Yin JJ, Zhang D, Bryant SH (2005) CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Nucleic Acids Research* 33: 192-196.
- Massapina C, Joaquim S, Matias D, Devauchelle N (1999) Oocyte and embryo quality in *Crassostrea gigas* (Portuguese strain) during a spawning period in Algarve, South Portugal. *Aquatic Living Resources* 12: 327.
- Matsumoto T, Nakamura AM, Mori K, Kayano T (2003) Molecular Characterization of a cDNA Encoding Putative Vitellogenin from the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Zoological Science* 20: 37-42.
- Matsumoto T, Nakamura AM, Mori K, Akivama I, Hirose H, Tahakashi Y (2007) Oyster estrogen receptor: cDNA cloning and immunolocalization. *General and Comparative Endocrinology* 151: 195-201

- Matsumoto T, Yamano K, Kitamura M, Hara A (2008) Ovarian follicle cells are the site of vitellogenin synthesis in the Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 149: 293.
- Nice HE, Morrith D, Crane M, Thorndyke M (2003) Long-term and transgenerational effects of nonylphenol exposure at a key stage in the development of *Crassostrea gigas*. Possible endocrine disruption? *Marine Ecology Progress Series* 256: 293-300.
- Niu D-K (2005) Low-level of illegitimate transcription of genes may be to silence the genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 337: 413-414
- Okumura T, Yamano K, Sakiyama K (2007) Vitellogenin gene expression and hemolymph vitellogenin during vitellogenesis, final maturation, and oviposition in female kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 147: 1028.
- Ortiz-Zarragoitia M, Cajaraville M (2006) Biomarkers of Exposure and Reproduction-Related Effects in Mussels Exposed to Endocrine Disruptors. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 50: 361-369.
- Osada M, Takamura T, Sato H (2003) Vitellogenin Synthesis in the Ovary of Scallop, *Patinopecten yessoensis*: Control by Estradiol-17 β and the Central Nervous System. *Journal of Experimental Zoology* 299A: 172-179
- Osada M, Tawarayama H, Mori K (2004) Estrogen synthesis in relation to gonadal development of Japanese scallop, *Patinopecten yessoensis*: gonadal profile and immunolocalization of P450 aromatase and estrogen. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 139: 123
- Pauley GB, Van der Raay B, Troutt D (1988) Species Profiles: Life Histories and Environmental Requirements of Coastal Fishes and Invertebrates (Pacific Northwest). Pacific oyster. *U.S. Fish and Wildlife Service. Biological Report 82 (11.85) U.S. Army Corps of Engineers, TR EL-82.4.*
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in Real-Time PCR. *Nucleic Acids Research* 29: 2000-2007.

- Pipe RK (1987) Oogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis*: an ultrastructural study. *Marine Biology* 95: 405-414.
- Porte C, Janer G, Lorusso LC, Ortiz-Zarragoitia M, Cajaraville M, Fossi MC, Canesi L (2006) Endocrine disruptors in marine organisms: Approaches and perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology, B* 143: 303-315.
- Puinean A, Rotchell J (2006) Vitellogenin gene expression as a biomarker of endocrine disruption in the invertebrate, *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research* 62: s211-s214
- Raven CP (1961) Oogenesis: The storage of developmental information. Pergamon Press. EU. 227 pp.
- Robert R, Gerard A (1999) Bivalve hatchery technology: The current situation for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the scallop *Pecten maximus* in France. *Aquatic Living Resources* 12: 121-130.
- Rodet F, Lelong C, Dubos MP, Costil K, Favrel P (2005) Molecular cloning of a molluscan gonadotropin-releasing hormone receptor orthologue specifically expressed in the gonad. *Biochimica et Biophysica Acta* 1730: 187-195.
- Rodet F, Lelong C, Dubos M-P, Favrel P (2008) Alternative splicing of a single precursor mRNA generates two subtypes of Gonadotropin-Releasing Hormone receptor orthologues and their variants in the bivalve mollusc *Crassostrea gigas*. *Gene* 414.
- Rodríguez-Jaramillo MC (2004) Efecto de la temperatura sobre la gametogénesis en el callo de hacha *Atrina maura* (Sowerby, 1835) (Bivalvia. Pinnidae) Tesis de Maestría en Ciencia Marinas. CICIMAR, La Paz, Mexico, 74 pp.
- Saavedra C, Bacherre E (2006) Bivalve genomics. *Aquaculture* 256: 1-14.
- Sadler JE (1998) Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annual Review of Biochemistry* 67: 395-424.
- Samain JF, Boudry P, Degremont L, Soletchnik P, Ropert M, Bedier E, Martin JL, Moal J, Mathieu M, Pouvreau S, Lambert C, Escoubas JM, Nicolas JL, Le Roux F (2004)

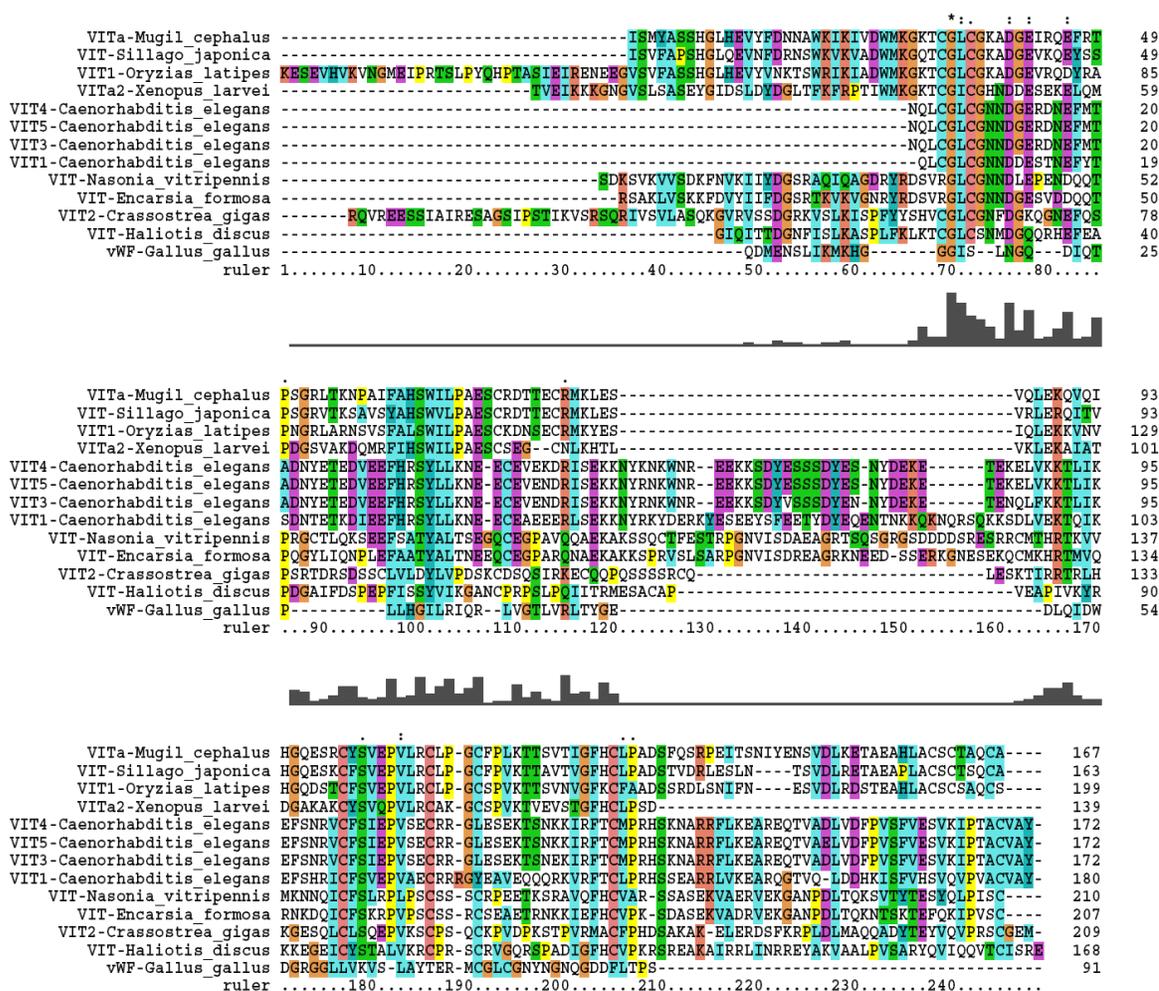
- Summer mortality in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, overview of 3-year results of the cooperative "MOREST" Project. *Journal of Shellfish Research* 23: 309
- Samain JF, Degremont L, Soletchnik P, Haure J, Bedier E, Ropert M, Moal J, Huvet A, Bacca H, Van Wormhoudt A, Delaporte M, Costil K, Pouvreau S, Lambert C, Boulo V, Soudant P, Nicolas JL, Le Roux F, Renault T, Gagnaire B, Geret F, Boutet I, Burgeot T, Boudry P (2007) Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture* 268: 227.
- Sappington TW, S. Raikhel A (1998) Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 28: 277
- Sawaguchi S, Koya Y, Yoshizaki N, Ohkubo N, Andoh T, Hiramatsu N, Sullivan CV, Hara A, Matsubara T (2005) Multiple Vitellogenins (Vgs) in Mosquitofish (*Gambusia affinis*): Identification and Characterization of Three Functional Vg Genes and Their Circulating and Yolk Protein Products. *Biology of Reproduction* 72: 1045-1060.
- Sawaguchi S, Ohkubo N, Matsubara T (2006) Identification of two forms of vitellogenin-derived phosvitin and elucidation of their fate and roles during oocyte maturation in the barfin flounder, *Verasper moseri*. *Zoological Science* 23: 1021-1029
- Shaw BL, Battle HI (1957) The gross and microscopical anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Canadian Journal of Zoology* 35: 325-347.
- Skippet JK, Hamilton TH (1977) Regulation by estrogen of the vitellogenin gene. *Proceedings of the National Academy of Science* 74,6: 2384-2388.
- Smolenaars MMW, Madsen O, Rodenburg KW, Van der Horst DJ (2007) Molecular diversity and evolution of the large lipid transfer protein superfamily. *Journal of Lipids Research* 48: 489-502.
- Spieth J, et. al. (1985) The *C. elegans* vitellogenin genes: short sequence repeats in the promoter regions and homology to the vertebrate genes. *Nucleic Acids Research* 13: 5283-5295 .

- Spieth J, Nettleton M, Zucker-Aprison E, Lea K, Blumenthal T (1991) Vitellogenin motifs conserved in nematodes and vertebrates. *Journal of Molecular Evolution* 32: 429-438.
- Suzuki T, Hara A, Yamaguchi K, Mori K (1992) Purification and localization of a vitelline-like protein from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Marine Biology* 113: 239-245.
- Tatusov RL, Koonin EV, Lipman DJ (1997) A genomic perspective on protein families. *Science* 278: 631-637.
- Tatusova TA, Madden TL (1999) Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiology letters* 174: 247-250 .
- Tsang W, Quackenbush LS, Chow BK, Tiu SH, He J, Chan S (2003) Organization of the shrimp vitellogenin gene: evidence of multiple genes and tissue specific expression by the ovary and hepatopancreas. *Gene* 303: 99.
- Tsukimura B (2001) Crustacean vitellogenesis: its role in oocyte development. *American Zoology* 41: 465-476
- Valdéz-Ramirez ME, Donval A, Le Pennec M (2002) Ultrastructural and biochemical criteria for determining normality in the mature oocytes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Shellfish Research* 21: 707-714.
- Valentine JW (1997) Cleavage patterns and the topology of the metazoan tree of life. *Proceedings of the National Academy of Science* 94: 8001-8005
- Wang H, Tan JTT, Emelyanov A, Korzh V, Gong Z (2005) Hepatic and hextrahepatic expression of vitellogenin genes in the zebrafish, *Danio rerio*. *Gene* 356: 91-100
- Winter CE, Penha C, Blumenthal T (1996) Comparison of a vitellogenin gene between two distantly related rhabditid nematode species. *Molecular Biology and Evolution* 13: 674-684.
- Zhu YY, Machleder EM, Chenchik A, Li R, Siebert PD (2001) Reverse transcriptase template switching: A SMART approach for full-length cDNA library construction. *Biotechniques* 30: 892-897.

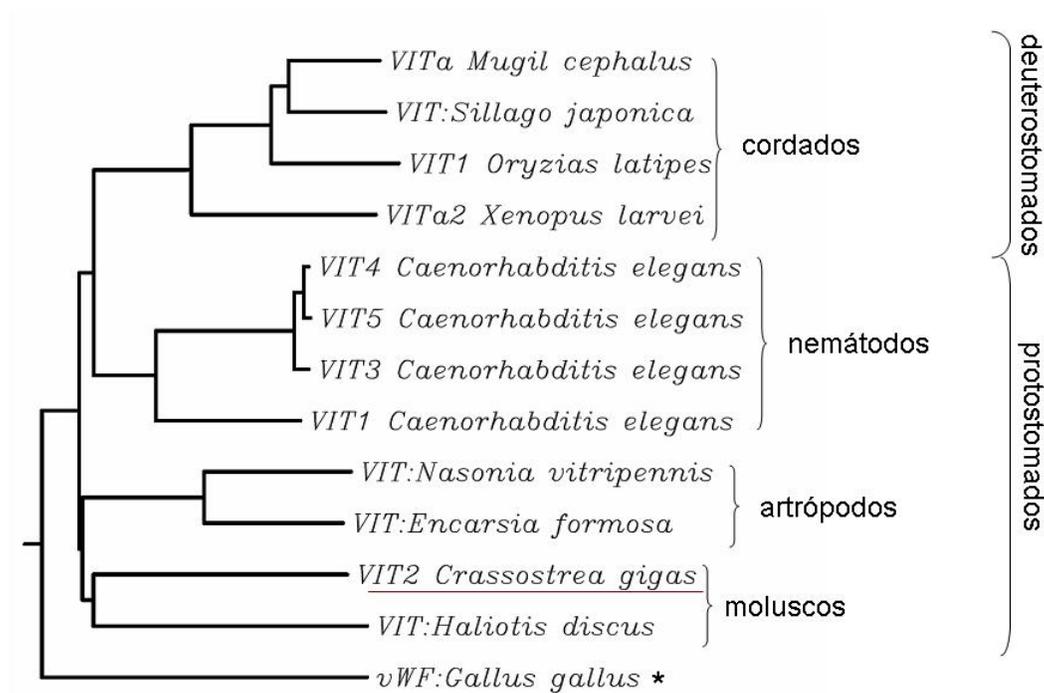
Ziegler R, van Antwerpen R (2006) Lipid uptake by insect oocytes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36: 264-272.

11. Anexos.

ANEXO I. Alineamiento múltiple con dominios vWD de vitelogeninas representativas para diversos *phyla*, realizado mediante el programa CLUSTALW (matriz BLOSUM para proteínas). Las secuencias parciales incluidas son (acceso GenBank entre paréntesis): vitelogenina A de *Mugil cephalus* (BAF64835.1); vitelogenina de *Sillago japonica* (BAC20186.1); vitelogenina 1 de *Oryzias latipes* (NP_001098147.1); vitelogenina 2 de *Crassostrea gigas* (presente estudio); vitelogenina de *Haliotis discus hannai* (BAF98238.1); vitelogeninas 1, 3, 4 y 5 de *Caenorhabditis elegans* (NP_509305.1, NP_508613, NP_508612.1, NP_508589.1); vitelogenina de *Nasonia vitripennis* (XP_001607388.1); vitelogenina de *Encarsia formosa* (AAT48601.1); vitelogenina A2 de *Xenopus larvei* (CAA68433.1); factor von Willebrand de *Gallus gallus* (XP_417223.2). Los colores de residuos representan las características fisicoquímicas (hidrofobicidad) de los mismos.



ANEXO II: Árbol de distancia (Neighbor-joining) para las secuencias codificantes del dominio von Willebrand en secuencias de vitelogeninas de diversos *phyla* empleadas para alineamiento múltiple (Anexo I). La longitud relativa de las ramas indica la similitud de secuencias o clusters.



*grupo externo

ANEXO III. Resumen de trabajo presentado en el congreso Physiomar 08, organizado por los institutos LEMAR-IUEM (UBO) e IFREMER, en la ciudad de Brest, Francia, del 1 al 4 de Septiembre de 2008.

Physiomar 08 – Brest, France – 1-4 September, 2008

Molecular characterization and expression analysis of a novel vitellogenin from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*

Raúl LLERA-HERRERA¹, Arnaud HUVET², Celia Gloria VAZQUEZ-BOUCARD¹

¹ Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. Apdo. Postal 128; La Paz, BCS 23090, Mexico

² UMR Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, Ifremer, BP 70, 97280. Plouzané, France

Email: rllera@cibnor.mx

Keywords: Crassostrea gigas, vitellogenin, oogenesis, reproduction, gene expression.

Vitellogenesis involves a selective transport of proteins and lipids into growing oocytes. This function has been attributed to vitellogenins, which are proteins grouped into the Large Lipid Transfer Protein (LLTP) superfamily. Among bivalves, there is one full-length sequence of vitellogenin reported in the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), isolated previously from *Crassostrea gigas* (CgVTG, access BAC22716), and some partial sequences of similar messengers isolated in Pectinidae and Mytilidae species. However, some evidence obtained in vertebrates and insects suggest that more than one vitellogenin gene could actively participate in vitellogenesis of many groups of metazoan, due to an ancient diversification of LLTP superfamily. This has been supported also by a genomic survey on public and private Expressed Sequence Tags (ESTs) databases, in where a particular contig (partial sequence resulted from overlapping of various different and consensus ESTs) presents significant similarity to insect and fish vitellogenins in conceptual translation by protein BLAST search algorithm. Surprisingly, no significant similarity was found with CgVTG; therefore, this could be the first report of homologous vitellogenin genes on a lophocotrozoan species. Full-sequencing of cDNA ends and phylogenetic analysis, currently under development, will provide information about the homology nature of two vitellogenins (i.e. orthology, paralogy), protein family relationships, and a better understanding of evolution and diversification of the LLTP superfamily in bivalve mollusks.

We are also interested to determine the expression profile over a complete gametogenic cycle. Preliminary analysis by end-point RT-PCR on gonad tissues shows a narrowly correlated expression between both messengers, related also with the oogenic developmental stage, and non-detectable expression on male gonads, suggesting a non-divergent evolutionary trait between both gene products. Quantitative technique of Real Time-PCR is under development, and will allow a more accurate description of temporal expression of each vitellogenin messengers during oogenesis.