



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

**Estudio de la expresión diferencial de genes en el ostión del Pacífico  
*Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), como respuesta a la exposición a un  
dinoflagelado productor de toxinas marinas de tipo diarreico.**

**TESIS**

Que para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales

(Orientación en Biotecnología)

P r e s e n t a

**Reyna de Jesús Romero Geraldo**

La Paz, Baja California Sur, Julio del 2013.

## ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 3 del Mes de julio del 2013, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**Estudio de la expresión diferencial de genes en el ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), como respuesta a la exposición a un dinoflagelado productor de toxinas marinas de tipo diarreico.**

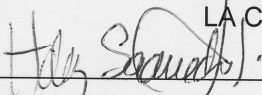
Presentada por el alumno:

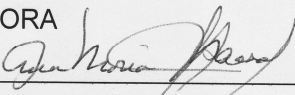
**Reyna de Jesús Romero Geraldo**

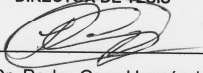
Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Biotecnología

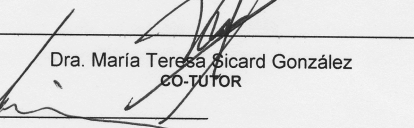
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.


### LA COMISION REVISORA

  
Dra. Norma Y. Hernández Saavedra  
DIRECTOR DE TESIS

  
Dra. Ana María Ibarra Humphries  
CO-TUTOR

  
Dr. Pedro Cruz Hernández  
CO-TUTOR

  
Dra. María Teresa Sicard González  
CO-TUTOR

  
Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle  
CO-TUTOR

**DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

## **CONFORMACIÓN DE COMITÉS**

### **Director de tesis**

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

### **Comité Tutorial**

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

Dra. Ana María Ibarra Humphries                      CIBNOR, Campus La Paz.

Dr. Pedro Cruz Hernández                      CIBNOR, Campus La Paz.

Dra. María Teresa Sicard González                      CIBNOR, Campus La Paz.

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle                      CIBNOR, Campus La Paz.

### **Jurado de Examen**

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

Dra. Ana María Ibarra Humphries                      CIBNOR, Campus La Paz.

Dr. Pedro Cruz Hernández                      CIBNOR, Campus La Paz.

Dra. María Teresa Sicard González                      CIBNOR, Campus La Paz.

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle                      CIBNOR, Campus La Paz.

### **Suplente**

Dr. Dariel Tovar Ramírez                      CIBNOR, Campus La Paz.

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes                      CIBNOR, Campus La Paz.

## RESUMEN

Las floraciones algales nocivas (FAN's) son fenómenos biológicos que ocurren de manera natural como resultado de la combinación de mecanismos oceanográficos. Entre los principales organismos causantes de FAN's, figuran las cianobacterias, diatomeas y dinoflagelados. Los dinoflagelados se consideran el componente principal del fitoplancton toxigénico seguido de las diatomeas. Las toxinas producidas por los dinoflagelados son bioacumuladas por organismos que se alimentan por filtración, como por ejemplo los moluscos bivalvos. En el presente trabajo se estudió la respuesta de *Crassostrea gigas* a *Prorocentrum lima* en dos talla juveniles (3-5 mm) donde mediante RT-PCR se identificó que en las primeras horas de exposición de *C. gigas* a *P. lima* (fase aguda), la respuesta fue mediante la expresión de genes de estrés *gs*, *gst*, *hsp70* y *sod Cu-Zn*, involucrados en los procesos de detoxificación, la variación significativa en la expresión de los genes está afectada por el tiempo y la concentración de células tóxicas. La expresión de estos genes fue inmediata, confirmándose que el mecanismo antioxidante es el primer mecanismo de respuesta de *C. gigas*. Posteriormente se realizó validación de genes de referencia (q-PCR), para estas condiciones experimentales, siendo *tub*, *act* y *ef1a* los más estables con base en los algoritmos utilizados: GeNorm, NormFinder y Bestkeeper. Además, Se observó mediante expresión relativa el nivel de transcritos de *p21*, *cafp55*, *fe2* y de respuesta inmune *lgbp*. Se determinó que existe una desregulación en la expresión de los genes asociados al control del ciclo celular y *P. lima* fue reconocido como agente infeccioso por el ostión. Así mismo, se analizó la respuesta molecular en glándula digestiva de ostiones juveniles (talla 40-60-mm) expuestos a *P. lima* en tratamiento subcrónico (10 días). Considerando el efecto tóxico de la principal toxina DSP, ácido okadaico (AO) se realizaron estudios de expresión de genes involucrados en el metabolismo del citoesqueleto *act* y *tub*, regulación del ciclo celular *p21*, *cafp55*, *fe2*, *p53* y respuesta inflamatoria *cp1*. El gen *ef1a* fue utilizado para normalizar el nivel de los transcritos. Por otro lado se determinó la tasa de aclaramiento y se realizó un estudio histológico para observar daño tisular por la presencia de *P. lima*. Los resultados revelan que la expresión de los genes de *act* y *tub* está modulada tanto por la presencia de *P. lima* así como por el tiempo de exposición al dinoflagelado. El gen *cp1* se sobreexpresó con exposición de sólo *P. lima*, lo cual indica que su presencia en *C. gigas* desencadena un proceso inflamatorio. En la cuantificación de transcritos de los genes relacionados al control del ciclo celular se observó una notoria desregulación a nivel de expresión tiempo-dependiente. El análisis histológico coincide con la expresión relativa observada, ya que se identifica claramente un daño celular y un proceso inflamatorio en el tejido. Una convergencia a nivel génico de este conjunto de moléculas reguladoras de la progresión del ciclo celular y su desregulación, nos puede llevar a entender la vulnerabilidad por pérdida de homeostasis por daño celular que pueda sufrir *C. gigas* mediante la inhibición de procesos de desfosforilación por el efecto inhibitorio de la presencia tóxica del AO. Se determinó la desregulación de la expresión de genes que participan en procesos vitales para fisiología celular y que puede llevar a estados críticos y anormales, así mismo, si se mantienen en el tiempo pueden ser causa del desarrollo de algunas patologías o muerte en *C. gigas*.

Palabras clave: *C. gigas*, ciclo celular, citoesqueleto, proteínas de estrés, *P. lima*.

## SUMMARY

Harmful algal blooms (HABs) are biological phenomena that occur naturally as a result of a combination of oceanographic mechanisms; among those are cyanobacteria, diatoms, and dinoflagellates. Dinoflagellates are considered the main component of toxicogenic phytoplankton followed by diatoms. The toxins produced by dinoflagellates are bioaccumulated by the organisms that feed by filtration, as bivalve mollusks. In this work we studied the response of *Crassostrea gigas* to *Prorocentrum lima* in two juvenile sizes (3-5 mm). During the first exposure hours to *P. lima*, *C. gigas* response (acute stage) was identified by RT-PCR through *gs*, *gst*, *hsp70*, and *sod* Cu-Zn stress gene expression, involved in detoxification processes, where significant gene expression variation is affected by time and toxic cell concentration. The expression of these genes was immediate, confirming that the antioxidant mechanism is the first one to respond in *C. gigas*. Afterwards, we proceeded to validate reference genes (q-PCR) for these experimental conditions, where *tub*, *act*, and *ef1a* were the most stable based on the algorithms used: GeNorm, NormFinder, and Bestkeeper. Besides, the transcript level of *p21*, *cafp55*, *fe2*, and *lgbp* immune response could be observed by relative expression. The existence of a gene expression deregulation associated to cell cycle control was determined, and *P. lima* was recognized as an infectious agent by the oyster. Likewise, the molecular response in juvenile (size 40-60-mm) oysters' digestive gland exposed to *P. lima* to a subchronic (10-day) treatment was analyzed. Considering the toxic effect of the main DSP toxin, okadaic acid (AO), we performed expression studies of *act* and *tub* genes involved in cytoskeleton metabolism, *p21*, *cafp55*, *fe2*, *p53* in cell cycle regulation, and *cp1* in inflammatory response. The *ef1a* gene was studied to normalize transcript levels. On the other hand, clearance rate was determined and a histological study was performed to observe tissue damage caused by *P. lima*. The results revealed that *act* and *tub* gene expressions levels are modulated both by *P. lima*'s presence as well as by time exposure to the dinoflagellate. The *cp1* gene was over-expressed when exposed to *P. lima* only, indicating that its presence in *C. gigas* releases an inflammatory process. When quantifying transcripts of the genes related to cell cycle control, we could observe a notorious deregulation at the level of time-dependent expression. The histological analysis agrees with the relative expression observed because it clearly identifies cell damage and inflammatory tissue process. A convergence at gene level of this set of cell cycle regulating molecules and its deregulation can lead us to understand vulnerability of cell damage by homeostasis loss that *C. gigas* suffers by inhibition of dephosphorylation processes by the effect of AO toxic presence. We determined expression deregulation of the genes participating in vital processes for cell physiology that could lead to critical abnormal states; likewise, if they are maintained, in time they could be the cause of developing some pathologies or death to *C. gigas*.

Key words: *C. gigas*, cell cycle, cytoskeleton, stress proteins, *P. lima*

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES EN EL OSTIÓN DEL PACÍFICO *CRASSOSTREA GIGAS* (THUNBERG, 1793), COMO RESPUESTA A LA EXPOSICIÓN A UN DINOFLAGELADO PRODUCTOR DE TOXINAS MARINAS DE TIPO DIARREICO.

*por*

Reyna de Jesús Romero Geraldo.

Laboratorio de Genética Molecular, Unidad de Patología Marina. Línea Estratégica Variabilidad y vulnerabilidad de ecosistemas marinos del noroeste mexicano, Programa de Ecología Pesquera. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C. (CIBNOR). Apartado Postal 128, La Paz 23000, B.C.S., México.

Esta tesis se basa principalmente en los siguientes manuscritos (Anexos):

- I. Reyna de Jesús Romero Geraldo. 2012. Respuesta del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) a la exposición aguda y subcrónica a *Prorocentrum lima* (Ehrenberg, 1860) Stein 1975, productor de toxinas diarreas, mediante el seguimiento de la expresión de genes específicos. p. 61-89. En: Biodiversidad y vulnerabilidad de ecosistemas costeros en BCS. Mónica Pérez-Ramírez y Salvador E. Lluch-Cota (Editores). ISBN 978-607-7634-07-2.
- II. Romero Geraldo Reyna de Jesús and Hernández-Saavedra Norma Yolanda\*. 2012. Stress Gene Expression in *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) in response to experimental exposure to the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge, 1975. Aquaculture Research doi: 10.1111/are.12100 (ISSN: 1355-557X).
- III. Romero Reyna J, García Norma and Norma Yolanda Hernández Saavedra\*. 2013. Effects of *in vitro* exposure to DTX producer *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge 1975 on *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) gene expression related to cell cycle regulation and immune response. Submitted to BMC Genomics (MS ID: 1914482987940063) (ISSN: 1471-2164).

## **DEDICATORIA**

A mis padres Anselmo Romero Lucero y María Elena Geraldo Fiol

A mi compañero de vida Eduardo Omar Salgado González

A mis hijos Jorge Alberto, Israel, Rafael y Reyna Beatriz

A los estudiantes de IBQ del Instituto Tecnológico de La Paz

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Norma Y. Hernández Saavedra por su confianza y apoyo para trabajar en el laboratorio de Genética Molecular, pero especialmente agradezco más su amistad.

GRACIAS a mi comité tutorial: Dra. Ana María Ibarra Humphries, Dr. Pedro Cruz Hernández, Dra. María Teresa Sicard González y al Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle a todos ellos gracias por apoyarme en los momentos necesarios.

Al Dr. Felipe Ascencio Valle por proporcionarme la infraestructura necesaria y permitir el acceso a su laboratorio cuando fue requerido.

GRACIAS a las Dras. Martha Reyes Becerril y Clara E. Galindo Sánchez, y a los técnicos Pedro Arturo Sierra Beltrán, Manuel Moreno Legorreta, Marte Virgen Félix y Julián Alfonso Garzón Favela, por su apoyo incondicional durante este proceso de aprendizaje.

A la M. C. Delia Irene Rojas Posadas del laboratorio de Genética Molecular por su disponibilidad.

GRACIAS a la maestra Diana Leticia Dorantes Salas por sus enseñanzas, revisión y edición de los artículos y edición del resumen en inglés de esta tesis.

GRACIAS Dr. Murugan Gopal, Dr. Nefalí Ochoa A., cDra. Norma García Lagunas, cDra. Angélica Herrera Sepúlveda y al Dr. Oscar González por coincidir y hacer más amena esta aventura, y por su invariable apoyo; salí ganando con su amistad.

A la IBQ. María de Jesús Romero Geraldo (CHULA) por sus enseñanzas en esta camino.

GRACIAS a M.C. Ignacio González, M.C. Mauricio Rodríguez y IBQ Flor Lucero por su apoyo y amistad incondicional durante **tantos** años.

Gracias al Instituto Tecnológico de La Paz y al personal del departamento de Ingenierías.

Gracias al CIBNOR y al personal de Posgrado, al Programa de Ecología Pesquera y gracias al CONACyT por la beca otorgada (No. 95202) y el financiamiento de esta tesis a través del proyecto CB07-083442.

Agradezco a todos y cada uno de Ustedes por haberme apoyado a llegar hasta aquí.



## CONTENIDO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b> -----  | <b>1</b>  |
| 1.1 Florecimientos algales nocivos o mareas rojas-----  | 1         |
| 1.2 Impacto económico y en la vida marina-----  | 2         |
| 1.3 Toxinas diarreicas o DST -----  | 3         |
| 1.4 Efectos de toxinas DSP en moluscos -----  | 4         |
| 1.4.1 Estrategias de protección de los organismos contra cambios en el ambiente ----                                      | 5         |
| <b>2. ANTECEDENTES</b> -----  | <b>8</b>  |
| 2.1 Floraciones algales nocivas (FANs) -----  | 8         |
| 2.2 Toxinas diarreicas (DSP)-----   | 9         |
| 2.3 Respuesta molecular en moluscos bivalvos bajo diversas condiciones de estrés ----                                     | 11        |
| 2.4 Genes seleccionados para estudiar la respuesta molecular de <i>C. gigas</i> ante la presencia de <i>P. lima</i> ----- | 12        |
| <b>3. JUSTIFICACIÓN</b> -----   | <b>16</b> |
| <b>4. OBJETIVOS</b> -----   | <b>18</b> |
| 4.1 Objetivo general -----  | 18        |
| 4.2 Objetivos particulares-----   | 18        |
| <b>5. HIPÓTESIS</b> -----   | <b>19</b> |
| <b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> -----  | <b>20</b> |
| 6.1 Bioensayos con juveniles de <i>C. gigas</i> (3-5 mm)-----   | 20        |
| 6.1.1 <i>C. gigas</i> -----   | 20        |
| 6.1.2 Microalgas ( <i>I. galbana</i> y <i>P. lima</i> ) -----   | 20        |
| 6.1.3 Diseño experimental y toma de muestras -----  | 21        |
| 6.1.4 Extracción de ARN total y síntesis de ADN complementario (ADNc)-----  | 22        |
| 6.1.5 Oligonucleótidos para RT-PCR y qPCR-----  | 23        |
| 6.1.6 Análisis gen-específico mediante RT-PCR -----   | 24        |
| 6.1.7 Estandarización de la eficiencia de amplificación por PCR en tiempo real (qPCR)-----                                | 27        |
| 6.1.8 Análisis de estabilidad de los genes de referencia candidatos -----   | 28        |
| 6.1.9 Análisis cuantitativo de expresión génica -----   | 29        |

|   |           |
|---|-----------|
| 6.2 Bioensayos con ostiones adultos de <i>C. gigas</i> -----  | 31        |
| 6.2.1 Pruebas preliminares para determinar la eficiencia de amplificación de los oligos diseñados para RT-PCR: expresión tejido-específica----- | 31        |
| 6.2.1.1 Extracción de ARN y síntesis de ADNc-----   | 31        |
| 6.2.1.2 Análisis de expresión de genes tejido-específica-----   | 32        |
| 6.2.2 Diseño experimental y toma de muestras-----   | 32        |
| 6.2.3 Extracción de ARN total y síntesis de ADN complementario (ADNc)-----  | 33        |
| 6.2.4 Análisis de estabilidad del gen de referencia <i>EF1-<math>\alpha</math></i> y análisis cuantitativo de la expresión génica -----         | 33        |
| 6.2.5 Determinación de las tasas de aclaramiento-----   | 34        |
| 6.2.6 Observaciones histológicas en tejidos de ostiones expuestos a <i>P. lima</i> -----  | 34        |
| <b>7. RESULTADOS -----</b>  | <b>36</b> |
| 7.1 Respuesta en la alimentación y tasas de aclaramiento -----  | 36        |
| 7.2 Análisis de estabilidad de los genes de referencia candidatos -----   | 37        |
| 7.2.1 Amplificación por qPCR de genes de referencia candidatos -----  | 37        |
| 7.2.2 Análisis de estabilidad por GeNorm -----  | 38        |
| 7.2.3 Análisis de estabilidad por NormFinder-----   | 39        |
| 7.2.4 Análisis de estabilidad por BestKeeper-----   | 40        |
| 7.3 Análisis gen seleccionado mediante RT-PCR y qPCR -----  | 41        |
| 7.3.1 Análisis de la expresión de proteínas de estrés mediante RT-PCR-----  | 43        |
| 7.3.2 Análisis de la expresión de genes de control de ciclo celular y de respuesta inmune -----   | 45        |
| 7.4 Bioensayo con <i>C. gigas</i> de talla (40-60 mm)-----  | 47        |
| 7.4.1 Eficiencia de amplificación de oligonucleótidos diseñados para RT-PCR. ----   | 47        |
| 7.4.2 Perfil de expresión de genes relacionados con citoesqueleto (2) y proceso inflamatorio (1) en glándula digestiva-----                     | 50        |
| 7.4.3 Perfil de expresión de genes relacionados con síntesis proteica (1) y regulación del ciclo celular (3) en glándula digestiva -----        | 53        |
| 7.4.4 Comportamiento de alimentación en <i>C. gigas</i> -----   | 56        |
| 7.4.5 Alteraciones histológicas en <i>C. gigas</i> -----  | 57        |
| <b>8. DISCUSIÓN -----</b>   | <b>61</b> |
| 8.1 Bioensayo de <i>C. gigas</i> de talla 3-5 mm -----  | 61        |
| 8.1.1. Respuesta de <i>C. gigas</i> en la alimentación -----  | 61        |

|  |           |
|--|-----------|
| 8.1.2 <i>Análisis de la expresión de genes de proteínas de estrés mediante RT-PCR</i> ----   | 61        |
| 8.1.3 <i>Análisis de la expresión diferencial génica de proteínas de regulación del ciclo celular mediante y respuesta inmune RT-PCR y qPCR</i> -----            | 66        |
| 8.1.4 <i>Validación de genes de referencia</i> -----   | 71        |
| 8.2 <i>Bioensayo de C. gigas tejido-específico talla 40-60 mm: glándula digestiva</i> -----  | 74        |
| 8.2.1 <i>Eficiencia de amplificación de oligonucleótidos diseñados para RT-PCR: expresión tejido-específico.</i> -----   | 74        |
| 8.2.2 <i>Análisis de la expresión diferencial génica de proteínas del citoesqueleto, caspasa, proteínas de regulación del ciclo celular mediante qPCR.</i> ----- | 74        |
| 8.2.3 <i>Análisis de la tasa de aclaramiento</i> -----   | 79        |
| 8.2.4 <i>Análisis histológico de estómago y glándula digestiva (40-60 mm)</i> -----  | 81        |
| <b>9. CONCLUSIONES</b> -----   | <b>83</b> |
| <b>10. LITERATURA CITADA</b> -----   | <b>85</b> |
| <b>11. ANEXOS</b> -----  | <b>99</b> |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Fotografías que muestran el comportamiento alimenticio de <i>C. gigas</i> durante el bioensayo.....   | 37 |
| <b>Figura 2.</b> Perfil de tamaño de amplicones para validación de genes de referencia en gel de agarosa/Synergel al 1% en TBE 1X. ....  | 37 |
| <b>Figura 3.</b> Curvas de disociación de genes de referencia candidatos.....  | 38 |
| <b>Figura 4.</b> Estabilidad de la expresión génica (M) de genes candidatos de referencia en <i>C. gigas</i> calculados con el software GeNorm. ....   | 39 |
| <b>Figura 5.</b> Análisis RT-PCR semi-cuantitativo de la expresión de genes de respuesta generalizada a estrés, expresados en <i>C. gigas</i> expuesto a <i>P. lima</i> .....                                  | 42 |
| <b>Figura 6.</b> Análisis RT-PCR semi-cuantitativo de la expresión de genes relacionados con el ciclo celular y sistema inmunológico de <i>C. gigas</i> expuesto a <i>P. lima</i> .....                        | 44 |
| <b>Figura 7.</b> Análisis qPCR de la expresión relativa de genes relacionados con la regulación del ciclo celular y respuesta inmune de <i>C. gigas</i> .....  | 46 |
| <b>Figura 8.</b> Perfil electroforético RT-PCR de 24 genes en 5 tejidos de <i>C. gigas</i> mantenidos en condiciones basales.....  | 49 |
| <b>Figura 9.</b> Análisis RT-PCR semi-cuantitativo de la expresión de 22 genes en cinco tejidos de ostión adulto mantenido en condiciones basales. ....  | 49 |
| <b>Figura 10.</b> Análisis qPCR de la expresión de genes relacionados con citoesqueleto y proceso inflamatorio en glándula digestiva de <i>C. gigas</i> .....  | 52 |
| <b>Figura 11.</b> Análisis qPCR de la expresión de genes relacionados con la síntesis de proteínas y la regulación del ciclo celular en glándula digestiva de <i>C. gigas</i> expuesto a <i>P. lima</i> . .... | 55 |
| <b>Figura 12.</b> Tasa de aclaramiento de <i>Crassostrea gigas</i> alimentados con <i>Prorocentrum lima</i> y/o <i>Isochrysis galbana</i> .....  | 57 |
| <b>Figura 13.</b> Histopatología de secciones transversales de estómago de <i>C. gigas</i> alimentado con <i>I. galbana</i> y con <i>P. lima</i> .....   | 60 |
| <b>Figura 14.</b> Histopatología de secciones transversales de glándula digestiva de <i>C. gigas</i> alimentado con <i>I. galbana</i> y <i>P. lima</i> .....   | 60 |

**LISTA DE TABLAS**

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla I.</b> Relación de genes estudiados y su función bioquímica.....  | 14 |
| <b>Tabla II.</b> Diseño experimental.....  | 21 |
| <b>Tabla III.</b> Características generales de los genes seleccionados en este estudio para RT-PCR.....  | 24 |
| <b>Tabla IV.</b> Relación de genes y características de los oligonucleótidos diseñados para los análisis de qPCR.....  | 26 |
| <b>Tabla V.</b> Genes de referencia candidatos: valores promedio de los Ct, eficiencia del PCR (%) y coeficiente de correlación ( $R^2$ ). .....   | 28 |
| <b>Tabla VI.</b> Valores de estabilidad de los genes de referencia candidatos calculados con NormFinder. ....  | 40 |
| <b>Tabla VII.</b> Análisis de correlación BestKeeper de muestras de <i>C. gigas</i> expuesto a <i>P. lima</i> (n=12). ....   | 40 |
| <b>Tabla VIII.</b> Relación de resultados de expresión de los genes en estudio en cinco tejidos de <i>C. gigas</i> adultos mantenidos en condiciones basales (por RT-PCR semi-cuantitativo)..... | 48 |

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Florecimientos algales nocivos o mareas rojas

El fitoplancton, que comprende al conjunto de organismos acuáticos autótrofos del plancton que tienen capacidad fotosintética y que viven dispersos en el agua, es un alimento esencial para los organismos filtradores, especialmente los moluscos bivalvos (ostiones, mejillones y almejas). Bajo ciertas condiciones (combinación de factores físicos, químicos y biológicos) como por ejemplo una situación de exceso de nutrientes y temperatura favorable, algunas especies del fitoplancton pueden multiplicarse formando lo que se suele llamar florecimiento (*bloom*, por su traducción al idioma inglés), marea roja o floraciones algales. Cuando se presentan estos eventos y ocasionan efectos negativos son denominados “Floraciones Algales Nocivas” (FAN), y pueden clasificarse como:

- Inocuos: son aquellos en los que las especies que forman el FAN producen cambios en la coloración de las masas de agua, siendo totalmente inofensivas; de hecho, en muchas ocasiones son benéficas y responsables de la alta productividad primaria de ciertas regiones de los océanos.
- Nocivos: las especies del fitoplancton florecen tan densamente que matan indiscriminadamente peces e invertebrados (especialmente en sistemas de cultivo intensivo) al agotar el oxígeno, disminuir el paso de la irradiación solar y obstruyendo y dañando sus sistemas respiratorios (branquias).
- Tóxicos: las especies que conforman los FAN (generalmente dinoflagelados, diatomeas o cianobacterias) producen toxinas, que se incorporan rápidamente en las cadenas tróficas; este tipo de florecimientos no necesariamente están asociados a cambios evidentes en la coloración de los cuerpos de agua.

Por tanto, los FAN pueden tener efectos negativos causando pérdidas económicas para la acuicultura, pesquerías y turismo, con su consecuente impacto negativo al ambiente y la salud humana (Hallegraeff, 1995; Anderson, 2007; Matsuyama y Shumway, 2009).

## 1.2 Impacto económico y en la vida marina

El impacto económico de las FAN es un aspecto de vital relevancia a nivel gubernamental e industrial, y presenta dificultad para su cálculo adecuado. Esto se debe a que no se reconocen o reportan adecuadamente los costos que conllevan estos fenómenos, como son: salud pública, industria de los alimentos y turismo. Los costos económicos se encuentran asociados a: 1) pérdida de la producción de granjas acuícolas y depresión del mercado de mariscos por desconfianza del consumidor aun cuando la amenaza haya pasado (efecto halo); 2) oferta de servicios de salud pública; 3) clausura de actividades de recreación y turismo al no poderse asegurar el desarrollo sin riesgos de estas actividades y a 4) limpieza y disposición final de flora y fauna acuática perecedera presente en playas y costas (Anderson et al., 2000). Anderson et al. (2000) estimaron el impacto económico anual por FAN en Estados Unidos, en el periodo 1987-1992, el promedio del impacto capitalizado a 15 años fue de \$449,291,987 millones de dlls/año; de lo que el 45% se atribuye a servicio de salud pública, el 37% a pérdidas en pesquerías, el 13% a recreación y turismo y el 4% a monitoreo y mantenimiento.

Para tener una idea del impacto que tienen las FAN en los ecosistemas marinos, en México, tan solo en el Estado de B.C.S. y Golfo de California, se han registrado mortandades masivas de lobos marinos, pelícanos, moluscos, langostas y peces (entre otros organismos), en los que el agente causal ha sido identificado como un evento FAN. En el caso de mamíferos y aves marinas la muerte ha sido consecuencia de cuadros de intoxicación y, en el caso de peces, ya sea por intoxicación o cianosis debida al abatimiento del oxígeno disuelto disponible, debido a las altas densidades de microalgas que se han presentado (SEMARNAT & PROFEPA 1997; Sierra-Beltrán et al., 1996, 1998, 2004; Gallo et al., 2001). Por ejemplo, la marea roja ocurrida durante agosto-septiembre de 2007 en la zona de Punta Abreojos tuvo un impacto significativo en los principales recursos pesqueros y acuícolas de importancia comercial, entre ellos: abulón, langosta, caracol, almeja pismo y ostión de cultivo, además de una gran variedad de especies de escama. Los estudios del Instituto Nacional de La Pesca a través del Centro Regional de Investigación Pesquera en La Paz (CRIP La Paz) realizados en septiembre de 2007 muestran una disminución del 40

% en la abundancia de abulón respecto al promedio de los últimos tres años, y 80 % en el caracol. En el caso de la langosta se observó una disminución cercana al 65% en la abundancia relativa, sugiriendo una posible disminución de más del 50% de la captura en la temporada 2007-2008. Además se observó 95 % de mortalidad en el cultivo de ostión (com. pers. Arturo Sierra-Beltrán, Lab. de Proteómica, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste).

### 1.3 Toxinas diarreicas o DST

Dentro de los efectos nocivos provocados por organismos tóxicos formadores de FAN, destaca la intoxicación diarreica por mariscos (*DSP*, por sus siglas en inglés), que es un evento tóxico en humanos causado por el consumo de mariscos contaminados, resultado de su exposición a ciertas especies de microalgas marinas que producen toxinas diarreicas, tales como dinoflagelados, que son los agentes causales más frecuentes de los FANs. A nivel mundial, un problema cada vez más significativo es el aumento en la distribución y la frecuencia de episodios FANs, en particular aquellos asociados con síndromes gastrointestinales. Las toxinas responsables del síndrome DSP son el ácido okadaico (AO) y las Dinofisistoxinas (DXTs), que son compuestos poliéter producidos por especies de los géneros *Prorocentrum* y *Dinophysis* (Doucet et al., 2007; Paul et al., 2007).

Los moluscos bivalvos acumulan altas concentraciones de toxinas en sus tejidos, por exposición y consumo de dinoflagelados tóxicos (Bauder y Cembella, 2000; Bauder et al., 2001), que es la vía de incorporación de las toxinas a las cadenas tróficas. El AO es un potente inhibidor de serin-treonin proteín-fosfatasas tipo 1 y 2A (Yasumoto et al., 1985), y es bien conocido por causar en los humanos episodios de diarrea, y otros síntomas gastrointestinales, cuando la toxina alcanza el tracto digestivo a través de la ingestión de moluscos contaminados (Quilliam y Wright, 1995). La potente actividad del AO se conserva en muchos grupos filogenéticos, dado que esta toxina inhibe la actividad de las fosfatasas en mamíferos, levaduras y plantas superiores (Cohen, 1989).

Varios estudios *in vitro* han demostrado que el AO funciona como un potente promotor de tumores, ya que induce una hiperfosforilación de proteínas supresoras de tumor y de reparación de daño celular (p.ej. p53) (Yatsunami et al., 1993; Milczarek et al., 1999). Los



efectos potenciales del AO son críticos para el desarrollo de las células, ya que se une a la subunidad catalítica de la fosfatasa 2A (principalmente), inhibiendo su actividad enzimática. De esta forma, pueden ser afectadas todas aquellas proteínas que son componentes en la ruta de señalamiento intracelular (en eucariotas), que a su vez regulan una gran variedad de procesos como el equilibrio de iones, la neurotransmisión, y la regulación del ciclo celular (incluida la regulación del metabolismo y la expresión génica) en los que la fosforilación reversible de sus componentes es un importante mecanismo de regulación y control de su actividad (Vale y Botana, 2008).

Aunque el mecanismo de acción del AO es bien conocido (Fujiki et al., 1999; Fujiki y Suganuma, 1999), los efectos ecológicos, fisiológicos y moleculares en los organismos marinos, aun hasta la fecha no se entienden claramente.

#### 1.4 Efectos de toxinas DSP en moluscos

Recientemente, investigadores de todo el mundo se han abocado al estudio de los efectos de la exposición de bivalvos a dinoflagelados tóxicos (Bardouil et al., 1993; Bauder y Cembella 2000; Bauder et al., 2001; Pearce et al., 2005; Wikfors, 2005; Hégaret et al., 2007; Stoecker et al., 2008; Campa-Córdova et al., 2009; Tran et al., 2010). Sin embargo, la mayoría de estos estudios se enfocan a la medición de las variaciones en su comportamiento y/o efectos fisiológicos, principalmente, como un resultado de la presencia o acumulación de la toxina, y/o su exposición al dinoflagelado tóxico (Vale y Botana, 2008). Algunos estudios incluyen análisis histológicos, en los que se han observado daños a nivel de tubo digestivo (De las Heras, 2009), diapédesis de hemocitos al intestino y necrosis en las células epiteliales del intestino (Galimany et al., 2008; Hégaret et al., 2009a), así en aquellos que analizan algunos parámetros de respuesta inmune, han encontrado reducción de la capacidad fagocítica e hiperplasia en hemocitos (Hégaret y Wikfors 2005a,b; Hégaret et al., 2010). En otros estudios se analizó la capacidad de bioacumulación de toxinas de moluscos expuestos a dinoflagelados tóxicos. En estos trabajos se observó que aunque los moluscos habían acumulado en los tejidos grandes cantidades de toxinas, su aspecto físico era normal, por lo que los autores concluyeron que el efecto de las toxinas en los bivalvos no puede ser medido mediante inspección visual

(Shumway y Cucci, 1987; Hégaret et al., 2009b). Estas observaciones, nos llevan a plantear las preguntas: ¿las toxinas diarreicas tienen algún efecto en los bivalvos? ¿existe algún efecto a nivel molecular? ¿la expresión de los genes a nivel transcripcional es regulada por la presencia de las toxinas? ¿qué genes son inducidos o reprimidos? ¿la exposición del bivalvo al dinoflagelado desencadena un mecanismo de apoptosis? ¿los efectos de la exposición de estadios tempranos de desarrollo de los bivalvos a organismos productores de toxinas diarreicas guarda alguna relación los eventos de mortalidad masiva observados en poblaciones silvestres y de cultivo?

#### *1.4.1 Estrategias de protección de los organismos contra cambios en el ambiente*

Todos los organismos vivos sobreviven mediante el mantenimiento estable de un estado fisiológico complejo, que se conoce de forma genérica como la homeostasis celular. Sin embargo, son las especies reactivas de oxígeno liberadas mediante un efector estresante, quienes perturban constantemente este estado (Chrousos y Gold, 1992). La respuesta celular contra el estrés protege contra el daño causado por la desviación del estado estable, siendo la primera barrera de defensa del sistema inmune innato presente en los moluscos bivalvos. Los estresores potenciales en el ambiente marino incluyen la presencia estacional de FAN, fluctuaciones de temperatura y contaminantes. En la literatura, es común encontrar observaciones del uso de la expresión génica como una herramienta para estudiar la respuesta celular. De esta forma se ha estudiado el proceso de detoxificación de metales por *Ostrea edulis* (Tanguy et al., 2003), además mediante análisis de patrones genéticos y expresión diferencial de genes se identificó la respuesta de *Crassostrea gigas* a condiciones de hipoxia (David et al., 2005), exposición a herbicidas (Tanguy et al., 2005), hidrocarburos y pesticidas (Boutet et al., 2004a), y bajo estrés por calor (Farcy et al., 2008).

En la presente tesis se realizaron investigaciones concernientes al estudio de la expresión génica de *Crassostrea gigas* expuesto a *Prorocentrum lima* productor de toxinas DSP. Se consideraron dos intervalos de tallas de organismos en estadio juvenil (de 3 a 5 mm y de 4 a 6 cm), dado que en etapa adulta esta especie es relativamente insensible a la toxina, siendo los estadios tempranos del desarrollo los más susceptibles a la intoxicación, debido a

que no cuentan con un sistema enzimático efectivo para eliminar la toxina, además de que su tasa metabólica de crecimiento es más alta (Vasconcelos et al., 2010).

En la primera parte de esta investigación se consideraron organismos de 3 a 5 mm de talla ya que corresponden al estadio más vulnerable dentro del sector acuícola al momento de la siembra y su impacto resulta directo al sector económico, y desde el punto de vista ecológico, esta talla corresponde a la principal cohorte responsable del reclutamiento poblacional. El seguimiento de expresión se realizó en dos fases: una fase aguda ( $\leq 24$  h) y una fase subcrónica (durante 14 d) en las que se ensayaron tres concentraciones del dinoflagelado tóxico ( $0.3 \times 10^3$ ;  $3 \times 10^3$  y  $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>). Para el seguimiento de la expresión génica se realizó un tamizado preliminar mediante la técnica de RT-PCR para determinar semi-cuantitativamente la expresión de 25 genes involucrados en siete procesos metabólicos (proteínas de respuesta generalizada a estrés, cadena respiratoria, regulación de ácidos nucleicos, comunicación celular, receptores de membrana y genes de respuesta inmune, de citoesqueleto, regulación proteica y metabolismo energético). Con base en esos resultados, se realizó una selección de los genes potencialmente regulados (en términos de sobreexpresión o subexpresión) para determinar su tasa de expresión mediante la técnica de qPCR.

En la segunda parte de la investigación, se analizaron organismos de 4-6 cm de talla. Para el seguimiento de la expresión génica se realizó un tamizado tejido-específico preliminar mediante la técnica de RT-PCR, con el fin de determinar semi-cuantitativamente la expresión de 25 genes involucrados en siete procesos metabólicos (proteínas de respuesta generalizada a estrés, cadena respiratoria, regulación de ácidos nucleicos, comunicación celular, receptores de membrana y genes de respuesta inmune, de citoesqueleto, regulación proteica y metabolismo energético). En este caso, el seguimiento de la expresión génica en las fases aguda y subcrónica se realizó probando dos concentraciones del dinoflagelado tóxico ( $3 \times 10^3$  y  $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) el análisis fue tejido-específico, los tejidos de los ostiones (hemocito, gónada, musculo, branquia, manto y glándula digestiva) se disectaron y se guardaron individualmente a  $-80^{\circ}\text{C}$  después de los retos con el dinoflagelado. Considerando los resultados preliminares de la expresión tejido-específica, se seleccionó a

la glándula digestiva como órgano blanco; el seguimiento de la expresión se realizó mediante la técnica de qPCR.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Floraciones algales nocivas (FANs)

Las floraciones algales nocivas (**FAN**) son fenómenos biológicos que ocurren de manera natural como resultado de la combinación de mecanismos oceanográficos. Las causas de las FANs no están claras, pero se cree que en algunas áreas los factores climáticos como el aumento de temperatura, la estabilidad de la columna de agua y baja salinidad son los más importantes (Hallegraf et al., 1995). Entre los principales organismos causantes de FAN, figuran las cianobacterias, diatomeas y dinoflagelados; la acumulación masiva de una o más especies que coexistan en densidades de  $1 \times 10^4$  a  $1 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>, y que forman el 95-99% de la biomasa total fitoplanctónica, se considera un evento de floración algal. El grado de toxicidad de cada tipo de evento depende directamente de la especie predominante que lo ocasiona. De las 5,000 especies de microalgas marinas existentes unas 300 pueden presentarse en cantidades tan elevadas que colorean la superficie del mar en las denominadas “floraciones” o “mareas rojas” (Hallegraf et al., 1995; Lindhal, 1998). De este grupo alrededor de 75 especies tienen la capacidad de producir potentes toxinas que se pueden transferir a través de las redes tróficas. Algunas especies pueden producir toxinas a bajas concentraciones debiendo contar con millones de células por litro para ser tóxicas, mientras que otras, como *Dinophysis* y *Alexandrium* resultan ser altamente perjudiciales en bajas concentraciones celulares (Hallegraf et al., 1995). De los organismos presentes en los FAN, los dinoflagelados se consideran el componente principal del fitoplancton toxigénico seguido de las diatomeas. Las toxinas producidas por los dinoflagelados son bioacumuladas por organismos que se alimentan por filtración, como por ejemplo los moluscos bivalvos que pueden acumular xenobióticos, bacterias fecales, dinoflagelados y/o sustancias tóxicas constituyéndose en un riesgo potencial para la salud humana al ser consumidos (Lacoste et al., 2002; Smayda, 2002; Saavedra y Bachére, 2006). Actualmente, la acumulación de toxinas y la condición de los organismos es un factor de especial interés en la comunidad científica, principalmente por su impacto económico, cultural y en la salud humana. La presencia de la FAN puede

inducir condiciones de estrés en los organismos filtradores y bajar su capacidad de respuesta de defensa (Shumway ,1990).

## 2.2 Toxinas diarreicas (DSP)

Las toxinas diarreicas son del tipo lipofílico e incluyen un grupo de compuestos polietéreos de elevado peso molecular que difieren en estructura química y actividad biológica. El grupo de toxinas DSP se divide en:

1. Toxinas ácidas – ácido okadaico y sus derivados (dinofisitoxinas)
2. Toxinas neutras – grupo de pectenotoxinas (PTXs)
3. Otras toxinas - yessotoxinas (YTX) y sus derivados

Las toxinas ácidas son las más representativas, el ácido okadaico (AO), la dinofisistoxina 1 (DTX-1), la dinofisistoxina 2 (DTX-2) y la dinofisistoxina 3 (DTX-3) pueden presentarse como una mezcla compleja de derivados ésteres, tanto en el plancton como en los moluscos bivalvos (Doucet et al., 2007). Se ha demostrado que el AO es un potente inhibidor de las serin/treonin fosfatasas tipos PP-1 y PP-2A, que provoca desregulación por hiperfosforilación de muchas proteínas celulares, por lo que en humanos su presencia está relacionada con cuadros clínicos de inflamación del tracto intestinal y diarrea (Paul et al., 2007).

En bivalvos, las toxinas DSP suelen acumularse en glándula digestiva (76%), gónada (12%), branquias, manto y músculo (<12%) (Bardovil et al., 1993; Bauder y Cembella, 2000; Bauder et al., 2001) provocando la formación de pseudoheces y patologías a nivel tisular y de respuesta inmune sistémica (Wikfors, 2005). Bauder y Cembella (2000) investigaron la viabilidad y el efecto tóxico de *Prorocentrum lima* sobre *Argopecten irradians* observando que *P. lima* fue capaz de sobrevivir y de llevar a cabo división celular tras su paso por el intestino, identificándose células viables en heces. En estudios más detallados en *C. gigas* expuesto a *P. lima*, a nivel histológico se ha observado dilatación de túbulos intestinales, desprendimiento de células del intestino e infiltración de hemocitos en manto, gónada y músculo (De las Heras, 2009). Estas observaciones resultan particularmente interesantes, dado que en los bivalvos que contienen la toxina no se

observan alteraciones macroscópicas en características físicas tales como color, olor, sabor, movimiento, tamaño o forma, es decir, exhiben apariencia normal por lo que no generan sospechas (Shumway y Cucci, 1987). Se ha documentado que la eliminación de la toxina es lenta, pudiendo permanecer en el tejido animal desde días hasta meses, ya que los organismos reducen su metabolismo como estrategia de supervivencia (Bauder et al., 2001).

Los organismos causantes del envenenamiento DSP son dinoflagelados de los géneros *Dinophysis* y *Prorocentrum* (Doucet et al., 2007; Paul et al., 2007) *Prorocentrum lima*, que se ha encontrado comúnmente en el Golfo de California (Ochoa et al., 1997), es un dinoflagelado tóxico, bentónico y epífito responsables de las mareas rojas en muchas localidades a lo largo de la costa del Pacífico de México; la presencia de DSP en humanos ha sido frecuentemente reportada (Moore et al., 2008; Van Dolah, 2000).

*P. lima* es un dinoflagelado cosmopolita distribuido en aguas templadas de arrecifes tropicales (Pistocchi et al., 2012). Aunque la incidencia de muerte debido a la intoxicación por OA no se ha reportado y la medición de su potencia tóxica es mucho menor que la de neurotóxicas marinas (vía intraperitoneal en ratones,  $DL_{50} = 192 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (Yasumoto et al., 1984), esta molécula se ha identificado como promotora de tumores (Saganuma et al., 1988). Considerando esto, surge la interrogante: ¿cuáles son los efectos de la exposición a organismos productores de toxinas DSP en dosis bajas, tanto en los seres humanos como en organismos silvestres como el ostión? En efecto, el AO actúa como un medicamento citostático al interferir con el control y la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular. De hecho, el potencial de AO de modificar estas proteínas llevó a especular que podría funcionar como un factor de crecimiento mitogénico exógeno (Windust et al., 1996). Por tanto, la expresión de genes relacionados con el ciclo celular y su estado funcional (la represión o inducción), puede funcionar como un biomarcador para entender y determinar los efectos de biotoxinas en los hábitats marinos.

Aunque los moluscos parecen ser vectores de la toxina no afectados durante eventos FAN, se han descrito cambios en el comportamiento fisiológico y las respuestas celulares de bivalvos ante la presencia de *Prorocentrum* (Wikfors, 2005). El efecto de la ingestión de microalgas tóxicas en bivalvos se ha estudiado a través del monitoreo de los cambios en la

ingestión, absorción, y en bioensayos de consumo de toxinas DSP. En estos trabajos se ha observado disminución en las tasas de supervivencia y deterioro en el desarrollo, así como un aumento en la desestabilización lisosomal en hepatopáncreas de larvas de ostras (Keppler et al., 2005).

### 2.3 Respuesta molecular en moluscos bivalvos bajo diversas condiciones de estrés

En *C. gigas* y otros moluscos bivalvos, se ha reportado que la respuesta de los organismos ante diversas condiciones de estrés *in vitro*, depende directamente del tipo de estrés al que son sometidos. Para estudiar la respuesta a condiciones de hipoxia (David et al., 2005), exposición a herbicidas (Tanguy et al., 2005) e hidrocarburos y pesticidas se ha usado como herramienta analítica la expresión diferencial de patrones genéticos. Ante exposición a pesticidas Boutet et al. (2004a) identificaron la expresión tejido-específica de cuatro clases de glutatión-S-transferasa. Farcy et al. (2008a) evaluaron los niveles de expresión transcripcional de genes que participan en la respuesta celular bajo condiciones de estrés térmico, aunque los niveles de expresión encontrados aún están bajo discusión. Ante la exposición de moluscos bivalvos a dinoflagelados tóxicos, se han podido identificar como signos de respuesta característicos: el cierre diferencial de valvas (Gainey y Shumway, 1988; Hégaret et al., 2007; Tran et al., 2010), reducción en la actividad de filtración (Cognie et al., 2001; Hégaret et al., 2007), reducción del metabolismo (Bauder et al., 2001), incremento en la producción de moco (Shumway y Cucci, 1987), disturbios mecánicos (Lacoste et al., 2002), desarrollo reproductivo anómalo (De las Heras, 2009), cambios en el consumo de oxígeno y actividad cardíaca errática (Gainey y Shumway, 1988), signos histopatológicos de daño (Pearce et al., 2005) y la activación de la respuesta del sistema inmune, bajo exposición tanto a dinoflagelados como a especies del género *Vibrio* y virus (Pipe y Coles, 1995; Tiscar y Mosca, 2004).

La respuesta de defensa inicia con la interacción de receptores celulares a nivel inductor-receptor y esta está a su vez asociada al flujo de iones a través de membrana plasmática, a los procesos de fosforilación y desfosforilación de proteínas específicas y a la formación de EROs o especies reactivas de oxígeno (las EROs actúan como mensajeros secundarios activado y/o reprimiendo la transcripción de genes ) (Buttermer et al., 2010), que muy



probablemente están implicados en los procesos de detoxificación y protección contra el daño celular causado por dicho estrés (Dahlhoff, 2004; Lacoste et al., 2002). Lo anterior ha sido ampliamente investigado y considera a este mecanismo como la primera línea de defensa de los organismos (Manduzio et al., 2005), además, las EROs producen daño oxidativo a macromoléculas fisiológicas tales como ADN, ARN, proteínas y lípidos. La capacidad de detoxificación de EROs de los ostiones, puede explicar e identificar las diferencias en tasas de supervivencia de los organismos.

Para entender las diferencias de susceptibilidad que existen entre larvas, juveniles y adultos en tratamientos subcrónicos, bajo el ataque de diversos patógenos, el estudio del sistema inmune en bivalvos ha sido abordado consistentemente, identificándose una mayor vulnerabilidad en larvas y juveniles; la respuesta de defensa del ostión adulto se asocia a un sistema inmune más eficiente, que se relaciona directamente con la etapa de desarrollo de los organismos (Renault, 2008; Vasconcelos et al., 2010).

Recientemente, en ensayos *in vitro* se ha encontrado que especies de algas nocivas como *Heterosigma akashiwo* (productor de brevetoxina), *Dinophysis acuminata* (productor de toxinas diarreicas) y *Alexandrium sp.* (productor toxinas paráliticas) afectan significativamente a la viabilidad y la fagocitosis en células inmunes en bivalvos (Mello et al., 2012; Haberkorn et al., 2010). Por tanto, el estudio de los efectos de las algas perjudiciales sobre el sistema inmune de los bivalvos, recientemente se ha convertido en un área de gran interés para los investigadores. En diferentes publicaciones se ha demostrado que los hemocitos, así como los algunos parámetros inmunes, pueden ser activados o modulados bajo la presencia de varias especies de microalgas tóxicas (Gainey y Shumway 1988; Galimany et al., 2008).

#### 2.4 Genes seleccionados para estudiar la respuesta molecular de *C. gigas* ante la presencia de *P. lima*

Considerando que se pueden presentar al menos dos tipos de patrones de expresión específicos (inducido-temporal y basal-constitutiva) de cada uno de los procesos metabólicos que ocurren durante la activación del sistema de defensa, se puede distinguir la respuesta a dos niveles: a) aguda o inmediata y b) subcrónica. Dado que es bien reconocido

que la interacción de receptores celulares inicia la respuesta de defensa y que no requiere la participación de productos obtenidos mediante activación transcripcional, las primeras respuestas asociadas a inductor-receptor son alteración en el flujo de iones a través de la membrana plasmática, la fosforilación-desfosforilación de proteínas específicas y la formación de EROs. Esta respuesta tiene lugar en los primeros 2-5 minutos, y se conoce como proceso o estrés oxidativo. Este proceso ha sido ampliamente investigado y se ha podido comprobar que es la primera línea de defensa de los organismos (Manduzio et al., 2005).

La activación de la transcripción de genes específicos, probablemente implicados en procesos de detoxificación y protección contra el daño celular causado por el estrés, se da gracias a la función de los EROs como mensajeros secundarios (Dahlhoff, 2004). Por tanto, es de esperarse que como parte de la respuesta de defensa inmediata del ostión (aguda) esté involucrada la expresión de genes de respuesta a estrés y cadena respiratoria, mientras que en la respuesta a mediano plazo (subcrónica) los genes involucrados corresponderán a aquellos relacionados a procesos metabólicos como la regulación de ciclo celular, la respuesta inmune, regulación proteica, metabolismo energético y la función del citoesqueleto (Tabla I).

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

| Nombre del gene   | Función  |
|---|--|
| Glutamina sintetasa<br>( <i>gs</i> )                                  | Esta enzima es esencial en el metabolismo del nitrógeno, cataliza la reacción química de glutamato y amonio para formar Glutamina (aminoácido con dos átomos de nitrógeno); su biosíntesis en el cuerpo ayuda a “limpiar” de amoníaco algunos tejidos.   |
| Glutación-S-transferasa<br>( <i>gst</i> )                             | Familia de enzimas detoxificantes que catalizan la conjugación de glutación reducido (a través del grupo sulfhidrilo) a centros electrofílicos en una amplia variedad de sustratos. Desintoxica, entre otros, lípidos peroxidados, puede enlazar toxinas y funcionar como transporte de proteínas.   |
| Proteína de shock térmico 70<br>( <i>hsp70</i> )                      | Proteínas de shock térmico de 70kDa. Familia de proteínas (chaperonas) que protegen a las células del estrés térmico y oxidativo al evitar la pérdida de estructura de las proteínas mediante su unión temporal a las mismas a través de los residuos hidrofóbicos; impide la agregación y facilita el plegamiento.  |
| Superóxido dismutasa tipo cobre-zinc<br>( <i>sod Cu-Zn</i> )          | La enzima superóxido dismutasa (SOD) es una importante defensa antioxidante en la mayoría de las células expuestas a oxígeno, al protegerlas de las reacciones dañinas del radical superóxido dismutándolo a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno.  |
| Peroxidasa melanogénica<br>( <i>pox</i> )                             | O mieloperoxidasa es una proteína lisosomal de la familia de las oxidoreductasas. Durante la ruta de respiratoria en células sanguíneas produce ácido hipocloroso a partir de peróxido de hidrógeno y oxida residuos de tirosina a radical tirosol. Tanto el ácido hipocloroso como el tirosol son citotóxicos, por lo que participa en mecanismos de defensa ante la invasión de bacterias y otros patógenos. |
| ATP-sintetasa<br>( <i>atpsb</i> )                                     | Actúa como un canal de iones que “devuelve” los protones a la matriz mitocondrial (abre y cierra catalizando la síntesis de ATP) y regula el flujo de proteínas a través del canal de proteínas.   |
| Canal iónico P2X4<br>( <i>p2x4</i> )                                  | Representa una familia de canales iónicos activados por ligando, con permeabilidad a Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> y Ca <sup>2+</sup> . Se localiza en todo el organismo y se expresan de manera abundante en el sistema nervioso.  |
| Citocromo oxidasa<br>( <i>coi</i> )                                   | Enzima óxido-reductasa que cataliza el último paso de la cadena de transporte electrónico, transfiere los electrones a moléculas de oxígeno y la reduce a 2H <sub>2</sub> O.   |
| Proteína p21<br>( <i>p21</i> )  | Proteína reguladora del ciclo celular a nivel de la fase G1 cuando existe crecimiento celular con síntesis de proteínas y ARN.   |
| Factor de ensamblaje de la cromatina<br>( <i>chrafp55</i> )           | Proteína que actúa en la acetilación de histonas (histona acetiltransferasa, HAT) y participa en la transcripción a través de la regulación de diferentes procesos celulares, de ensamblaje y maduración de la cromatina.  |
| Proteína p53<br>( <i>p53</i> )  | En los mamíferos la proteína p53 desempeña un papel central en la supervisión de la integridad del genoma, además de otras funciones importantes en la detención del ciclo celular, reparación del ADN, en la apoptosis y la carcinogénesis.   |
| Factor de elongación 2<br>( <i>fe2</i> )                              | Es una enzima de la familia de las GTPasa que participa en la elongación durante la síntesis de proteína.  |
| Inmunolectina B<br>( <i>immlb</i> )                                   | Son proteínas de origen no inmune que generan los organismos; pueden aglutinar células y son capaces de un reconocimiento específico. Favorecen a los organismos aglutinando (capturando) los agentes extraños al cuerpo (virus, bacterias, parásitos, etc.) facilitando así la acción de los propios mecanismos de defensa naturales (p. ej. activación del complemento por la vía de las lectinas).          |
| Caspasa 1<br>( <i>cp1</i> )   | Pertencen a una familia de cisteín-aspartato proteasas altamente específicas y conservadas; constituyen el núcleo de la maquinaria para la apoptosis celular.  |
| Proteína de unión a lipolisacárido y β-1,3 glucano<br>( <i>lgbp</i> ) | Participa en la activación de la cascada profenoloxidasa que es una respuesta general de sistema inmune innato en invertebrados.   |

|   |  |
|---|--|
| Actina (GIA)<br>( <i>act</i> )                | El citoesqueleto de actina es una red dinámica de polímeros de actina y gran variedad de proteínas asociadas. Sus principales funciones fisiológicas están relacionadas con la motilidad celular y los cambios de forma de la célula durante el ciclo celular. Es esencial en algunas funciones contráctiles y controla interacciones celulares, adhesión molecular y transporte intracelular. |
| Actina citoplasmática<br>( <i>acc3</i> )      | Se presenta en la mayoría de las células eucariotas no musculares, así como en mioblastos indiferenciados. Se localiza en regiones periféricas móviles y la región perinuclear, lo que implica una señal de localización que es única que puede reflejar procesos relacionados con la motilidad celular.   |
| $\beta$ -Tubulina<br>( <i>tub</i> )           | Principal componente del citoesqueleto. Los microtúbulos intervienen en diversos procesos celulares que involucran desplazamiento de vesículas de secreción, movimiento de orgánulos, transporte intracelular de sustancias, así como durante la división celular (mitosis y meiosis).   |
| Lisozima ( <i>liz</i> )                       | Es una enzima que daña las células bacterianas catalizando la hidrólisis de las uniones beta 1,4 entre los residuos de ácido N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina en un peptidoglicano.   |
| Inhibidor de proteinasas<br>( <i>inserp</i> ) | Participan en la regulación de la actividad proteolítica de las proteasas diana, para el bloqueo de éstas en casos de emergencia o para la señalización de las interacciones del receptor y su eliminación.  |
| Fosfatasa alcalina<br>( <i>alkp</i> )         | Enzima responsable de liberar grupos fosfatos (desfosforilación) de varios tipos de moléculas como nucleótidos, proteínas y alcaloides, facilitando la energía libre para que continúen los procesos metabólicos celulares.  |
| $\beta$ 1-3 Glucanasa<br>( <i>glns</i> )      | Enzima implicada en procesos de degradación de la pared celular fúngica; es sintetizada como mecanismo de defensa y produce inhibición del crecimiento microbiano.   |
| Citocromo p450<br>( <i>cyp450</i> )           | Son un grupo grande y diverso de enzimas que generalmente constituyen la primera fase de desintoxicación clase I en los organismos. Estas enzimas, metabolizan una amplia variedad de sustratos, tales como ácidos grasos, hormonas y xenobióticos.  |
| Tripsina<br>( <i>trip</i> )                   | Es una enzima que hidroliza enlaces peptídicos en las proteínas para formar péptidos de menor tamaño y liberar aminoácidos.  |
| 28s ribosomal                                 | ARN ribosomal subunidad 28S.   |

(Mathews, 2003; Galindo y Flores, 2006; Farcy et al., 2008b).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Un aspecto importante que hay que observar en las investigaciones que se han realizado hasta la fecha, es que los signos fisiológicos y moleculares generalmente se han determinado en organismos de talla comercial (juveniles-adultos) y se han relacionado con signos fisiológicos y de respuesta inmune. No obstante, los moluscos bivalvos durante su ciclo de vida presentan al menos 3 estadios bien reconocidos: larva, juvenil y adulto, de los que en relación al estudio de retos con dinoflagelados tóxicos, los estadios de larva o de juvenil pequeño (3-5 mm, lo que los acuicultores denominan “semillas”) han sido escasamente estudiados y son más susceptibles a la intoxicación que juveniles de mayor talla y adultos, debido a que no cuentan con un sistema enzimático efectivo para eliminar las toxinas, y su tasa metabólica de crecimiento es más alta (Vasconcelos et al., 2010). Así mismo, el estudio de organismos de 3 a 5 mm de talla, que como se mencionó corresponden al estadio más vulnerable al momento de la siembra y su impacto resulta directo al sector económico, no solo es importante desde el punto de vista económico, sino que su importancia ecológica es fundamental para mantener la estabilidad de las poblaciones silvestres, ya que corresponde a la principal cohorte responsable del reclutamiento poblacional y uno de los eslabones más débiles de las cadenas alimenticias. Aunque existen algunos estudios que tratan sobre los procesos moleculares y rutas metabólicas involucradas en respuesta a toxinas, estos están lejos de ser bien entendidos. Se tiene mucha información a nivel molecular acerca de la respuesta de moluscos ante cambios ambientales y/o presencia de contaminantes. A pesar de los antecedentes, hasta la fecha aún no se ha podido determinar el origen de las mortandades masivas de ostión y mucho menos su correlación con eventos FANs.

Complementario a esto, y particularmente para enriquecer el conocimiento del transcriptoma de *C. gigas* en su interacción con *P. lima*, se estudió el perfil de expresión de genes previamente reportados como regulados ante la presencia de hidrocarburos y metales (Boutet et al., 2004). Los estudios presentados en este trabajo son fundamentales para entender el comportamiento molecular y metabólico del ostión en procesos cuyo estresor es

la presencia de diferentes concentraciones de *P. lima*. Son particularmente relevantes, la cuantificación de la expresión de genes involucrados en respuesta a estrés y respuesta inmune como parte de un reconocimiento inicial e inmediato, así como el estudio de genes involucrados en el mantenimiento de la homeostasis celular (condición fisiológica estable) como son los involucrados en citoesqueleto para el mantenimiento de la integridad celular y regulación de ciclo celular, para asegurar la salud del organismo.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Determinar el efecto de la exposición de *C. gigas* a *P. lima* (productor de toxinas DSP), a través del seguimiento de la expresión de genes específicos.

### **4.2 Objetivos particulares**

- 1) Analizar y evaluar cuantitativamente la tasa de expresión de genes relacionados con el metabolismo en juveniles (3-5 mm) de *C. gigas*, como respuesta al efecto de una exposición aguda y subcrónica a *P. lima* mediante RT-PCR y qPCR.
  
- 2) Determinar y cuantificar la expresión diferencial de genes en glándula digestiva por efecto de una exposición aguda y subcrónica a *P. lima* en juveniles (4-6 cm) de *C. gigas* mediante RT-qPCR.

## 5. HIPÓTESIS

Si la exposición de *C. gigas* a *P. lima* provoca cambios drásticos y diferenciales en la expresión de genes relacionados con el metabolismo, entonces, estos cambios serán detectables a dos niveles:

- Exposición aguda: cambios en las tasas de expresión de genes de respuesta a estrés y cadena respiratoria.
- Exposición subcrónica: cambios diferenciales en las tasas de expresión de genes relacionados con el metabolismo y en particular de la respuesta inmune, citoesqueleto, regulación de ciclo celular, comunicación celular y regulación proteica.



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Bioensayos con juveniles de *C. gigas* (3-5 mm)

#### 6.1.1 *C. gigas*

Se utilizaron organismos diploides de tallas entre 3-5 mm, del laboratorio de producción “Acuicultura Robles SPR de RP”. Los organismos se aclimataron en el Laboratorio Húmedo de Seguridad Biológica (LHSB, CIBNOR) por un periodo de dos semanas, en recipientes plásticos de 10 L con agua de mar filtrada (0.45  $\mu\text{m}$ ), a 21°C ( $\pm$  1°C), con flujo de oxígeno y salinidad controlada (34 ups). La dieta consistió de  $7.5 \times 10^5$  cel mL<sup>-1</sup> de *Isochrysis galbana* libre de bacterias, obtenida del Laboratorio de Alimento Vivo del CIBNOR.

#### 6.1.2 Microalgas (*I. galbana* y *P. lima*)

En este estudio se utilizó el dinoflagelado epibentónico *P. lima* (cepa PRL-1) aislado de la Isla El Pardito, ubicada en la Bahía de La Paz (24.5 ° N, 110.4 ° W), en el Golfo de California, BCS, México (Heredia-Tapia et al., 2002). El contenido de toxinas de esta cepa de *P. lima* (bajo condiciones de cultivo estándar en el CIBNOR) se caracterizó por LC/MS como: AO=2.041 pg/célula, DTX1=1,33 pg/célula y DTX2=0,09 pg/célula (Núñez-Vázquez et al., 2003; González-Rivera, 2009; Cohen et al., 2010).

*P. lima* se cultivó en medio F/2 + Se (Guillard y Ryther, 1975), preparado con agua de mar filtrada (0.45 $\mu\text{m}$ ) y esterilizada con luz ultravioleta (Ajuzie, 2007). Los cultivos, se realizaron en matraces Fernbach de policarbonato con una capacidad de 2.8 L, utilizando 1/3 de su capacidad, con ciclos 12:12 h de luz:oscuridad y una intensidad luminosa de 150  $\mu\text{m}^2/\text{s}$ , la salinidad fue de 35 g L<sup>-1</sup>, a 23 °C  $\pm$  1. En la fase exponencial tardía (día 18), se obtuvieron  $30 \times 10^6$  cel L<sup>-1</sup>.

*I. galbana* se obtuvo (de cultivos en matraz) del Laboratorio de Alimento vivo del CIBNOR. Como esta microalga se utiliza frecuentemente como alimento para larvas y reproductores de moluscos bivalvos dadas sus propiedades nutricionales (Gerdes, 1983; Bougrier et al., 1997), en este estudio se utilizó como dieta para descartar los efectos por inanición y como dieta libre de toxinas DSP (control negativo). Para calcular la

concentración de células de las microalgas *I. galbana* y *P. lima*, se realizaron conteos de células al microscopio, utilizando una cámara de Neubauer (0,1 mm de profundidad) y cámara de Sedgwick-Rafter respectivamente. Para obtener las concentraciones requeridas para cada tratamiento, *P. lima* se colectó por centrifugación (800 x g durante 10 min a 4 °C) al final de la fase exponencial de crecimiento de cada cultivo (Guéguen et al., 2008) y la concentración de células se ajustó con agua de mar estéril.

### 6.1.3 Diseño experimental y toma de muestras

Para determinar la respuesta, en términos de expresión génica en juveniles de *C. gigas* expuestos al dinoflagelado productor de toxinas DSP *P. lima*, se realizó un bioensayo dividido en dos fases: una de exposición aguda ( $\leq 24$  h) y otra de exposición subcrónica (336 h), probando en cada una tres concentraciones del dinoflagelado (Tabla II).

Brevemente, los organismos se colocaron en frascos de vidrio (100 mL), utilizando la mitad de su capacidad (50 mL) con un total de 20 organismos/frasco. Los organismos se aclimataron cuatro días previos al bioensayo, con una dieta a base de *I. galbana* ( $7.5 \times 10^5$  cel mL<sup>-1</sup>). En los bioensayos se utilizó como alimento una proporción 1:1 (v/v) de las 2 microalgas (*I. galbana* y *P. lima*) en un volumen final de 50 mL. Cada tratamiento (concentración de *P. lima*) se realizó por triplicado; las microalgas se proporcionaron en una sola dosis diaria. Las unidades experimentales contaban con un sistema de aireación constante y se mantuvieron a una temperatura de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  (clima artificial automatizado). Los organismos fueron expuestos a diferentes concentraciones celulares para tener una exposición directa al dinoflagelado tóxico (Tabla II).

**Tabla II.** Diseño experimental.

| Tratamientos | N  | Microalgas (cel mL <sup>-1</sup> ) |                   |
|--------------|----|------------------------------------|-------------------|
|              |    | <i>I. galbana</i>                  | <i>P. lima</i>    |
| Control      | 3n | $0.75 \times 10^6$                 | cero              |
| TR1          | 3n | $0.75 \times 10^6$                 | $0.3 \times 10^3$ |
| TR2          | 3n | $0.75 \times 10^6$                 | $3 \times 10^3$   |
| TR3          | 3n | $0.75 \times 10^6$                 | $30 \times 10^3$  |

Notas: Tres (3), es el número de repeticiones; n = 25, es el número de ostiones juveniles por unidad experimental. Siendo N=75, el número de ostiones.

Se realizaron cuatro muestreos durante la fase aguda a las cero, 3, 6, y 24 h de exposición, y en la fase subcrónica tres, correspondientes a las 72, 168 y 336 h. En cada toma de muestras se colectaron 5 organismos de cada réplica y tratamiento, los organismos colectados se enjuagaron abundantemente con agua de mar estéril y se hizo un homogenado por réplica, que se etiquetó y almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis. Una vez terminado el periodo de exposición, los organismos fueron mantenidos en las unidades experimentales durante 5 días más, alimentados sólo con *I. galbana* (depuración) para tomar una última muestra.

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

Se realizó la extracción de ARN total de todas las muestras del bioensayo utilizando el método de tiocianato de guanidina, usando solución AGPC (tiocianato de guanidina-acetato de sodio-fenol-cloroformo) (Chomczynski y Sacchi, 1987). Para determinar la cantidad y calidad del ARN extraído, las muestras se leyeron en un espectrofotómetro-UV Nanodrop 2000® (Thermo Scientific) utilizando el coeficiente de la relación de las lecturas de la absorbancia a 260 y 280 nm.

La integridad y pureza del ARN extraído se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%-TBE 1X preparado con agua DEPC. La ausencia de contaminación por ADN genómico en las muestras de ARN total obtenidas, se verificó mediante PCR directo utilizando los cebadores *Cg-28SF*, 5'-GCAGGAAAAGAACTAAC-3'; *Cg-28SR*, 5'-CCTCTAAGTGGTTTCAC-3' que amplifican un fragmento de 400 pb del gen 28S ribosomal. En las reacciones de PCR se utilizó como templado 1  $\mu\text{L}$  de cada muestra de ARN sin diluir (500-1500  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ ), y como control positivo una muestra de ADN complementario de *C. gigas*; el control negativo contenía la mezcla de reacción sin templado. Una vez verificada la ausencia de contaminación por ADN, se realizó la síntesis de ADNc con el kit Improm-II™ Reverse Transcription System (Promega®), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, para la síntesis se utilizaron 4  $\mu\text{L}$  de ARN a una concentración de 250  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$  (1  $\mu\text{g}$ ), 0.5  $\mu\text{g}$  de oligo dT (0.5-1  $\mu\text{M}$ ), 1  $\mu\text{L}$  (200 U) de transcriptasa reversa.

### 6.1.5 Oligonucleótidos para RT-PCR y qPCR

Se seleccionaron secuencias específicas de *C. gigas* reportadas en el banco de genes (NCBI) para 23 genes implicados en diferentes procesos metabólicos (Tabla III) diseñados por Hernández-Saavedra (2009). Los oligonucleótidos utilizando fueron sintetizados por Sigma-Aldrich Corporation. Para los análisis de qPCR, se diseñaron nuevos oligonucleótidos tomando como referencia las secuencias los genes de *C. gigas* previamente seleccionados y que se encuentran depositadas en el GeneBank (Tabla IV). Para calcular la  $T_m$  (temperatura de hibridación), contenido GC y el tamaño de los fragmentos se utilizaron los software primer3 ([http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)) y DNAMAN® (<http://www.lynnon.com/>), y para corroborar la ausencia de formación de estructuras secundarias se utilizó el software RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>). Por último, para verificar la especificidad a *C. gigas* se secuenciaron y realizaron alineamientos de los fragmentos esperados mediante un análisis de homología con las secuencias depositadas en el Gen Bank, usando el BLASTnt (Basic Local Alignment and Search Tool, NCBI), disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

**Tabla III.** Características generales de los genes seleccionados en este estudio para RT-PCR.

| Gen   | No. acceso GenBank | Nombre del oligo | Longitud del amplicón (pb) | Metabolismo                    |
|---|--------------------|------------------|----------------------------|--------------------------------|
| Glutamina sintetasa                                   | AJ558239           | cgGS             | 402                        |                                |
| Glutación-S-transferasa                               | CB617406           | cgGST            | 272                        |                                |
| Proteína de shock térmico 70                          | AJ305325           | cgHSP70          | 480                        |                                |
| Proteína de shock térmico 90                          | EF687776           | cgHSP90          | 491                        | Proteínas de estrés            |
| Superóxido dismutasa tipo CuZn                        | AJ496219           | cgCuSOD          | 542                        |                                |
| Peroxidasa melanogénica subunidad beta, ATP-sintetasa | CB617557           | cgPOXM           | 450                        |                                |
| Subunidad P2X4, canal iónico                          | CF369132           | cgATPSb          | 416                        |                                |
| Citocromo oxidasa I                                   | CB617507           | cgP2X4           | 400                        | Cadena respiratoria            |
| Proteína p21  | AB033687           | cgCOI            | 483                        |                                |
| Sub. 1 del factor de ensamblaje p55                   | CB617437           | cgP21            | 640                        |                                |
| Factor de elongación 2                                | CB617555           | cgCHRAfp55       | 500                        | Regulación de ácidos nucleicos |
| Ímunolectina B  | CB617558           | cgFE2            | 455                        |                                |
| LPS y $\beta$ -1,3 glucano                            | CB617455           | cgIMMLB          | 542                        |                                |
| Lectina hepática                                      | CB617438           | cgLPSBP          | 455                        |                                |
| $\beta$ -timosina                                     | CB617560           | cgLH             | 620                        | Respuesta inmune               |
| Actina (GIA)  | CB617380           | cgTHYM           | 455                        |                                |
| Actina citoplasmática A3                              | AF026063           | cgACTN           | 582                        | Citoesqueleto                  |
| Tubulina  | CF369133           | cgACTCA          | 364                        |                                |
| Lisozima  | CB617442           | cgTUB            | 393                        |                                |
| Tripsina  | CB617495           | cgLIZ            | 415                        |                                |
| Inhibidor de proteasas (Ser o Cys)                    | CB617494           | cgTRIP           | 278                        | Regulación proteica            |
| Fosfatasa alcalina                                    | CB617554           | cgINSERP         | 432                        |                                |
| Glucanasa $\beta$ -1,3 28S                            | CB617556           | cgALKP           | 351                        | Mantenimiento energético       |
|   | CB617548           | cgGLNS           | 390                        |                                |
|   | AY632555           | cg28S            | 300                        | Control                        |

### 6.1.6 Análisis gen-específico mediante RT-PCR

Para la amplificación de las regiones específicas de los genes blanco, en un tubo eppendorf de 200  $\mu$ L se colocaron 1  $\mu$ L de ADNc (300 ng) y 1  $\mu$ L del oligonucleótido F y 1  $\mu$ L del oligonucleótido R (10 picomoles de cada oligo). Aparte, se preparó la mezcla de reacción: por cada reacción se adicionaron 5  $\mu$ L del buffer 10X PCR (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl, Invitrogen 18067-017), 1  $\mu$ L de dNTPs 10 mM, 0.2  $\mu$ L de Taq polimerasa (5 U/ $\mu$ L) y 39.3  $\mu$ L de agua destilada estéril. La reacción se mezcló con micropipeta y se colocaron 47  $\mu$ L de ésta a cada tubo que contenía el ADNc y los

oligonucleótidos, completando un volumen final de 50  $\mu$ L. Antes de colocarlos en el termociclador (Corbette Palm Cycler), a los tubos se les dio un pulso en la centrifuga y se sometieron a las siguientes condiciones de amplificación: un ciclo de desnaturalización inicial 95°C/5 min; 35 ciclos de desnaturalización 94°C/1 min, alineamiento 45°C/1 min, extensión 72°C/1 min; y un ciclo de extensión final a 72°C/10 min. Los productos de PCR (amplicones) se analizaron en geles de agarosa/Synergel® al 1% en buffer TBE 1X. Brevemente, se cargaron 10  $\mu$ L de cada producto de PCR más 1  $\mu$ L de buffer de carga (0.025% de azul de bromofenol, 70% glicerol, 12mM EDTA); la electroforesis se desarrolló en cámaras horizontales (Mini Sub Cell, Biorad) a 80 V durante 1 h. Los geles se fotodocumentaron en un sistema UVITEC (UVP Inc®) bajo las siguientes condiciones: foco 2, aumento 25X y brillo 0.400. Los niveles de expresión se determinaron usando el software UVIDOC V. 97, con el que mediante análisis densitométricos de las imágenes digitales se obtuvieron los datos (intensidad de la banda), reportándose para cada uno de los genes analizados como unidades de intensidad relativa.

**Tabla IV.** Relación de genes y características de los oligonucleótidos diseñados para los análisis de qPCR.

| Oligonucleotico                                | Secuencia 5'-3'                                     | Nombre del gen  | Amplificación (pb) | GenBank  |
|--|---|---|--------------------|----------|
| Cg- 28S-Fw<br>Cg- 28S-Rv                       | GGAGTCGGGTTGTTTGAGAATGC<br>GTTCTTTTCAACTTTCCCTCACGG | <i>Subunidad ribosomal 28S</i>                                  | 114                | AY632555 |
| Cg- GAPDH-Fw<br>Cg- GAPDH-Rv                   | GTTCAAATATGATTCAACTCACGG<br>TGGATCCCGTTCGCAATATACG  | <i>Gliceraldehído3-fosfato deshidrogenasa</i>                   | 109                | AJ544886 |
| Cg-TUB-Fw*<br>Cg-TUB-Rv*                       | AGCAGATGTCGTAGAGAGCTTC<br>TGAACACATTCTCCGTTGTCCC    | <i>Tubulina <math>\beta</math>5</i>                             | 144                | CB617442 |
| Cg-ACT-Fw*<br>Cg-ACT-Rv*                       | TACTCTTTACCACCACAGCCG<br>TAGAGATGAGGATGAAGCAGCAG    | <i>Actina (GIA)</i>   | 117                | AF026063 |
| Cg-EF-1 $\alpha$ -Fw*<br>Cg-EF-1 $\alpha$ -Rv* | ACCATACAGTGAGGCTCGATTTC<br>GTGGAAGCCTCAATCATGTTATC  | <i>Factor de elongación 1-<math>\alpha</math></i>               | 138                | AB122066 |
| Cg-p21-Fw<br>Cg-p21-Rv                         | TTCCCATTCCTCCCATGTTGTTTC<br>ACAGGCGACATGGATTTAGAAGC | <i>Proteína p21 reguladora del ciclo celular</i>                | 100                | CB617437 |
| Cg-CAFp55-Fw<br>Cg-CAFp55-Rv                   | TCGAAGATCCCACAAAGCAACAG<br>TGTCCTTCAACCCCTACAGCGA   | <i>Factor 1 de ensamblaje de cromatina<br/>Subunidad p55</i>    | 77                 | CB617555 |
| Cg-EF2-Fw<br>Cg-EF2-Rv                         | TTGATCACGGCAAGTCTACTCTG<br>GAGATGGCAGTGGACTTGATGG   | <i>Factor de elongación 2</i>                                   | 109                | CB617558 |
| Cg-p53-Fw<br>Cg-p53-Rv                         | CTGTAGTTCTGGCCCGTGAA<br>AAACACAAGGGCACCACAAG        | <i>Proteína P53</i>   | 110                | AM236465 |
| Cg-CP1-Fw<br>Cg-CP1-Rv                         | ACTACAGAAAGCCGCCGAAT<br>GATCATTCTGTGCTACCCCC        | <i>Caspasa 1</i>  | 87                 | HQ425703 |
| Cg-LGBP-Fw<br>Cg-LGBP-Rv                       | TTGTCCAGTTCTCCCAGCTTCC<br>GACACTGGAATGGGATGAAGAAC   | <i>Proteína de unión a LPS y <math>\beta</math>-1,3 glucano</i> | 108                | CB617438 |
| Cg-GS-Fw<br>Cg-GS-Rv                           | CAAACCCCAAAGAATGCCCTGT<br>GAAGACCTCACACATCACCAGC    | <i>Glutamina sintetasa</i>                                      | 153                | AJ558239 |
| Cg-GST-Fw<br>Cg-GST-Rv                         | GACCCAGATGACCCTTACCG<br>CCGAAACAACTGAGAGAAGACC      | <i>Glutación S-transferasa</i>                                  | 71                 | CB617406 |
| Cg-Cu/ZnSOD-Fw<br>Cg- Cu/ZnSOD-Rv              | CACAAAATGATTGACTTGGCCGG<br>CACTCCACAAGCCAATCGTCCG   | <i>Superóxido dismutasa Cobre/Zinc</i>                          | 144                | AJ496219 |
| Cg-COI-Fw<br>Cg-COI-Rv                         | GTGTATGTCCTTATTCTTCCAGG<br>GCACGCGTATCAATATCCATTCC  | <i>Citocromo C oxidasa I</i>                                    | 182                | AB033687 |
| Cg-CPY450-Fw<br>Cg-CPY450-Rv                   | ACAGGGACTTCATTGACAGCATG<br>ATTGTGAAACGAGTACTGTCTACC | <i>Citocromo p450</i>   | 151                | EF645271 |
| Cg-TRYP-Fw<br>Cg-TRYP-Rv                       | GCCAGTGACGTAAGACAACCTCG<br>CAACCATCAACAACGACATTGCC  | <i>Tripsina</i>   | 125                | CB617494 |

\* indica cuales son los genes de referencia que se utilizaron para realizar el análisis de expresión relativa

### 6.1.7 Estandarización de la eficiencia de amplificación por PCR en tiempo real (qPCR)

El análisis de la eficiencia es crucial en la cuantificación de expresión por la qPCR, debido a que está fuertemente influenciado por los componentes de la reacción (Pfaffl, 2004). La eficiencia (E) de la PCR en tiempo real se define como la capacidad de la reacción para duplicar el número de copias de las cadenas de ADN o ADNc en cada ciclo (Bustin y Nolan, 2004a). La eficiencia de la PCR en tiempo real se calcula a partir de las pendientes de la curva estándar obtenida después de realizar diluciones seriadas con las reacciones de la PCR de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$E=10[-1/\text{pendiente}]^{-1} \text{ (Pfaffl, 2004)} \quad (1)$$

Para llevar a cabo la qPCR, se utilizaron los siguientes componentes por reacción: 1.5  $\mu\text{L}$  de Buffer 10x (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl, Invitrogen 18067-017), 0.75  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50 mM), 0.5  $\mu\text{L}$  de dNTPS (2mM), 0.75  $\mu\text{L}$  de Eva Green (20X) (Biotium, CA), 0.3 U de Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen 10966-018), 1.4  $\mu\text{L}$  de oligonucleótidos (forward y reverse), 5  $\mu\text{L}$  de ADNc y 5.8  $\mu\text{L}$  de agua miliQ en un volumen final de 15  $\mu\text{L}$ ; como control negativo se utilizó agua miliQ. Los tubos se colocaron en un termociclador RotorGene 6000, ajustándose las siguientes condiciones de amplificación: un ciclo de desnaturalización a 95°C/10 min; 40 ciclos de desnaturalización a 95°C/15 s, alineamiento 61°C/1 min, polimerización a 74°C/20 s. Finalmente se construyeron curvas de disociación de 65°C a 95°C con un incremento de 1°C cada 1 s. A partir estas curvas se verificó que la amplificación de los genes mostrara productos únicos y específicos, visualizados como un solo pico para cada gen.

Posteriormente, se determinó la eficiencia de la qPCR para cada uno de los oligonucleótidos de los diferentes genes evaluados: genes de referencia o controles internos (Tabla V). A partir de cuatro diluciones seriadas (1:5), se preparó una mezcla común ADNc que contenía el ADNc de los diferentes controles y tratamientos. Se construyó una curva estándar para cada uno de los genes de referencia así como para los genes blanco. Las amplificaciones para cada una de las diluciones se realizaron por triplicado, utilizando el ADNc de las muestras del bioensayo subcrónico con juveniles de *C. gigas* de 3-5 mm. Los valores de eficiencia fueron obtenidos de la pendiente de la regresión lineal de las



concentraciones graficadas contra la fluorescencia, utilizando la ecuación (1); se utilizó un valor umbral de fluorescencia fijo. Los valores de eficiencia fueron utilizados para la corrección de eficiencia específica para cada gen en los análisis de estabilidad de GeNorm.

**Tabla V.** Genes de referencia candidatos: valores promedio de los Ct, eficiencia del PCR (%) y coeficiente de correlación ( $R^2$ ).

| GENES | <i>act</i> | <i>tub</i> | <i>gapdh</i> | <i>28s</i> | <i>ef1-<math>\alpha</math></i> |
|-------|------------|------------|--------------|------------|--------------------------------|
| Ct    | 26.17      | 25.41      | 28.29        | 22.51      | 24.89                          |
| E     | 95         | 96         | 100          | 97         | 94                             |
| $R^2$ | 0.98       | 0.99       | 0.99         | 0.99       | 0.98                           |

#### 6.1.8 Análisis de estabilidad de los genes de referencia candidatos

Algunos de los genes de referencia (GR) más utilizados incluyen la  $\beta$ -actina, gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa, hipoxantina guanina fosforibosil-transferasa y 18S del ARN ribosomal. La elección correcta de los genes de referencia para la normalización de PCR en tiempo real es esencial. Se ha demostrado que el uso de un sólo gen como gen de referencia es susceptible a tener errores en la interpretación de los resultados. Como consecuencia, para normalizar las expresión de los genes es necesario utilizar más de un gen de referencia, por lo que es necesario validar GRs para cada condición experimental (Huggett et al., 2005).

En este trabajo se probaron 5 genes que podrían servir como genes de referencia (Tabla V). Una vez que fueron determinadas las curvas estándar, dichos genes se corrieron con las muestras de los bioensayos (muestras de los días 7 y 14: para la dieta con sólo *I. galbana* y la dieta mezclada *I. galbana/P. lima* a  $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) utilizando los siguientes componentes por reacción: 1.5  $\mu$ L de Buffer 10x (200 mM Tris-HCl pH 8.4), 500 mM KCl, Invitrogen 18067-017), 0.75  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0.5  $\mu$ L de dNTPS (2 mM), 0.75  $\mu$ L de Eva Green (20X) (Biotium, CA), 0.3 U de Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen 10966-018), 1.4  $\mu$ L de oligonucleótidos (forward y reverse), 5  $\mu$ L de ADNc (0.64 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup>) y 5.8  $\mu$ L de agua miliQ en un volumen final de 15  $\mu$ L, como control negativo se utilizó agua miliQ.

El uso de modelos matemáticos adecuados para estimar la estabilidad de la expresión de los genes bajo diferentes condiciones es un punto crítico. Por tanto, para analizar la estabilidad de los genes de referencia candidatos, los valores de Ct ó Cq (número de ciclos en los que la curva de fluorescencia atraviesa el umbral de detección establecido) obtenidos para cada gen, fueron analizados utilizando los programas GeNorm (Vandesompele et al., 2002), NormFinder (Andersen et al., 2004) y BestKeeper (Pfaffl, 2004), que son los más utilizados para determinar la estabilidad de los GRs. Primero se realizó un análisis utilizando la liga RefFinder (<http://www.leonxie.com/referencegene.php?type=reference#>) y posteriormente, se realizó otro análisis utilizando las macros disponibles que hay para los programas antes mencionados. Con el programa GeNorm, los valores obtenidos de Cq se transformaron en cantidades relativas (Q) con un nivel de expresión máximo de 1 (Manual GeNorm, 2008, Vandesompele et al., 2002), aplicando la siguiente ecuación.

$$Q = E^{\text{delta } Cq} \quad (2)$$

$$Q = E^{(\text{min } Cq - \text{sample } Cq)} \quad (3)$$

dónde:

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

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

$\text{min } Cq$ : menor valor de Cq = Valor de Cq de las muestras con menor expresión.

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

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

BestKeeper, es un programa que se basa en un análisis de correlación pareada de los genes candidatos (Pfaffl, 2004). BestKeeper estima la correlación del nivel de expresión entre todos los posibles candidatos. Los genes altamente correlacionados son combinados en un índice. Después de calcularse la correlación pareada entre cada candidato y el índice, se explica la relación entre el índice y la contribución del gen candidato.

#### *6.1.9 Análisis cuantitativo de expresión génica*

Una vez optimizadas las condiciones para la qPCR (mezclas de reactivos, concentración de los oligonucleótidos, concentración del marcador fluorescente y de las muestras), así como los genes de referencia que se van a utilizar, se continuó con la cuantificación de la expresión de los genes blanco. En este caso, la estrategia de cuantificación para el análisis de la expresión génica fue la cuantificación relativa.

Los cálculos en la cuantificación relativa se basan en la comparación de los valores Ct utilizando la eficiencia de la reacción de la PCR como factor de corrección. Sin embargo, hay un modelo que no requiere la eficiencia de la reacción para acceder a un factor de corrección, dicho modelo supone una eficiencia óptima e idéntica (correspondiente al 100%) en la eficiencia de reacción en las PCR tanto del gen en estudio como del gen de referencia (Bustin et al., 2005). Considerando esto, en este trabajo se utilizó el método de  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ , debido a que este método no requiere la eficiencia de reacción como factor de corrección y expresa la proporción obtenida de la relación entre los valores Ct de la muestra y los valores Ct del control (Pfaffl, 2004), mediante la siguiente ecuación:

$$\text{radio} = 2^{-[\Delta\text{CP muestra} - \Delta\text{CP control}]} \quad (4)$$

$$\text{radio} = 2^{-\Delta\Delta\text{CP}} \quad (5)$$

Este método no requiere correr curvas estándar en cada corrida, cada muestra es primeramente estandarizada a la cantidad y concentración de templado que se utilizó por comparación relativa con el gen de referencia. Estos valores estandarizados son entonces normalizados relativamente a un tratamiento calibrador, este puede ser el control (no tratado), muestras, tiempo o tejido.

## 6.2 Bioensayos con ostiones adultos de *C. gigas*

### 6.2.1 Pruebas preliminares para determinar la eficiencia de amplificación de los oligos diseñados para RT-PCR: expresión tejido-específica

Para este estudio se utilizaron organismos adultos de 100 mm de talla, los cuales fueron donados por el Laboratorio de Genética Acuícola del CIBNOR. Los organismos se disectaron con un bisturí y se colectaron muestras de branquia, músculo aductor, hemolinfa, gónada y glándula digestiva, de los que se prepararon homogenados de cada tejido considerando 3 organismos en cada uno.

La muestra de hemocitos se tomó mediante la extracción directa de hemolinfa de la cavidad pericárdica; los hemocitos se separaron por centrifugación a 700 xg durante 10 min/4°C descartando el plasma. Posteriormente, estas muestras se manejaron bajo los mismos procedimientos experimentales que el resto de los tejidos.

#### 6.2.1.1 Extracción de ARN y síntesis de ADNc

El ARN total se extrajo utilizando TRIzol (TRIzol® Plus RNA Purification Kit, Invitrogen) usando una proporción de 750 µL de reactivo por cada 50 mg de tejido, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para eliminar una posible contaminación por ADN genómico se realizó una segunda extracción. La concentración de ARN se determinó mediante espectrofotometría-UV Nanodrop 2000® (Thermo Scientific) midiendo la

absorbancia a 260 y 280 nm y considerando un factor de conversión de 1 OD = 40µg/mL ARN. Para comprobar la ausencia de contaminación por ADN genómico se llevó a cabo un PCR directo, de acuerdo al procedimiento citado en la sección 6.1.4. El ARN total (2.5 µg) se utilizó para la síntesis de ADNc con oligo (dT) 500 µg mL<sup>-1</sup> y 1 µL (200 U) Transcriptasa reversa (SuperScript™II RT, Invitrogen) de acuerdo al procedimiento citado en la sección 6.1.4.

#### 6.2.1.2 Análisis de expresión de genes tejido-específica

Para el análisis de expresión gen-tejido específico, se procedió de la forma descrita en la sección 6.1.6. Una vez que se corroboró la eficiencia de amplificación, la identidad de los amplicones (Hernández Sánchez, 2009; Álvarez Cárdenas, 2009; Gutiérrez Kinejara, 2010) y la expresión tejido-específica, se continuó con el diseño experimental y se montó el bioensayo de exposición de organismos de 40 a 60 mm de talla.

#### 6.2.2 Diseño experimental y toma de muestras

Para determinar la respuesta, en términos de expresión génica en juveniles de 40-60 mm de *C. gigas* expuestos al dinoflagelado productor de toxinas DSP *P. lima*, se realizó un bioensayo dividido en dos fases: una de exposición aguda ( $\leq 24$  h) y otra de exposición subcrónica (336 h), probando en cada una dos concentraciones del dinoflagelado (TR2 y TR3, Tabla II). Para realizar el bioensayo se utilizaron recipientes de 4 L, en los que se colocaron dos cedazos de PVC cerrados por un extremo con tela de plástico, que sirvieron como soporte para colocar 10 organismos en cada uno; en total se colocaron 20 organismos en cada unidad experimental. El bioensayo consistió en alimentar a los ostiones con mezclas de *I. galbana* 3 x 10<sup>6</sup> cel mL<sup>-1</sup> + *P. lima* 3 x 10<sup>3</sup> cel mL<sup>-1</sup> (TR2) e *I. galbana* 3 x 10<sup>6</sup> cel mL<sup>-1</sup> + *P. lima* 30 x 10<sup>3</sup> cel mL<sup>-1</sup> (TR3), una dieta sólo con *P. lima* 3 x 10<sup>3</sup> cel mL<sup>-1</sup> (control positivo) y una dieta sólo con *I. galbana* 3 x 10<sup>6</sup> cel mL<sup>-1</sup> (control negativo). Cada tratamiento (concentración de *P. lima* y/o *I. galbana*) se realizó por triplicado; las microalgas se proporcionaron en una sola dosis diaria. Las unidades experimentales contaban con un sistema de aireación constante y se mantuvieron a una temperatura de 22 ± 1°C (clima artificial automatizado). Se realizaron cinco muestreos durante la fase aguda a las 0, 3, 6, 12 y 24 h de exposición, y en la fase subcrónica cuatro, correspondientes a las

72, 168, 240 y 336 h. En cada toma de muestras se colectaron 4 organismos de cada réplica y tratamiento. Los organismos muestreados de cada unidad experimental se remplazaron por otros, previamente marcados, de tal forma que el número de organismos en cada unidad experimental se mantuvo constante. Adicionalmente, se tomó un organismo por tratamiento/réplica al final del periodo de exposición (7 días) para análisis histológicos.

Una vez colectadas, las muestras se procesaron en la siguiente secuencia: de cada uno de los 4 organismos de cada réplica, primero se extrajo la hemolinfa (directamente del pericardio) con una jeringa de 3 mL haciendo una mezcla de entre 1.5 a 2 mL de hemolinfa por organismo. La hemolinfa se centrifugó a  $800 \times g$  por 5 min., y tanto el paquete celular como el sobrenadante (plasma) fueron inmediatamente etiquetados y almacenados por separado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis. Posteriormente, los organismos se disectaron colectando por separado muestras de los 5 tejidos a estudiar (branquia, gónada, glándula digestiva, músculo y palpos labiales), con los que se hizo una mezcla por tejido (de los 4 organismos muestreados por réplica). Finalmente, para llevar a cabo la extracción del ARN, se tomó una muestra homogénea de aproximadamente 20 mg de cada mezcla de tejidos (por réplica), y el tejido restante se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  para futuros análisis.

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

Se realizó la extracción de ARN total de todas las muestras del bioensayo utilizando el método de tiocianato de guanidina (Chomczynski y Sacchi, 1987) y la síntesis de ADNc con el kit Improm-II<sup>TM</sup> Reverse Transcription System (Promega®), de acuerdo a los procedimientos previamente señalados en el punto 6.1.4.

#### *6.2.4 Análisis de estabilidad del gen de referencia EF1 $\alpha$ y análisis cuantitativo de la expresión génica.*

Para el análisis de estabilidad del gen de referencia EF1 $\alpha$ , primero se realizó la curva estándar con la mezcla de ADNc de los controles y tratamientos en los tiempos 24, 72, 168 y 240 h. Posteriormente, se validó el gen de referencia con cada una de las muestras. El análisis de estabilidad se realizó mediante una ANOVA, y el análisis cuantitativo de expresión génica se realizó de acuerdo al protocolo descrito en la sección 6.1.9 de este documento.

### 6.2.5 Determinación de las tasas de aclaramiento

Para poder realizar un análisis integral de los resultados, se hicieron observaciones de supervivencia y comportamiento alimenticio, este último midiendo la tasa de aclaramiento de los organismos sometidos a los diversos tratamientos. Para esto se tomaron muestras de agua de cada una de las unidades experimentales al inicio y al finalizar el experimento, y se fijaron con solución de Lugol (Gifford y Caron, 2000). Posteriormente se determinó el número de células en las muestras, utilizando un microscopio estereoscópico (Reichart Stereo Star Zoom) usando el objetivo 40X. Finalmente, se calculó la tasa de aclaramiento (TA) en L/h usando la siguiente ecuación (Coughlan, 1969):

$$TA = \text{Ln} (N_0/N_t) * M/t \quad (6)$$

dónde:  $N_0$  es la concentración inicial de la microalga,  $N_t$  es la concentración después de 24 horas,  $M$  es el volumen total que se utilizó en cada unidad experimental y  $t$  el tiempo después de iniciar el experimento (24 h).

### 6.2.6 Observaciones histológicas en tejidos de ostiones expuestos a *P. lima*

Para la determinación de alteraciones histológicas, se tomó un organismo completo de cada réplica por cada tratamiento al día 7, se les retiró la concha, se envolvieron en gasa y se fijaron en solución Davidson (Shaw y Battle, 1957 citado en Howard y Smith, 1983) por 48 h. Posteriormente se colocaron en etanol al 70%, conservándose bajo estas condiciones hasta su posterior análisis. Para llevar a cabo las observaciones histológicas las muestras fueron deshidratadas en una serie progresiva de etanol al 70, 80, 95 y 100 %, aclaradas en xileno e incluidas en parafina (Paraplas X-Tra). Se realizaron 6 cortes transversales de los organismos completos para observar el daño; los cortes fueron preparados en secciones de 4  $\mu\text{m}$  de grosor, utilizando un micrótopo rotatorio y por último fueron montadas en portaobjetos de vidrio y teñidas por 5 minutos con hematoxilina de Harry y 12 min con eosina (Humason, 1979; Hrapchak y Sheehan, 1973). Las láminas fueron examinadas bajo un microscopio de luz para determinar las lesiones en los tejidos. Cabe mencionar que el procesamiento histológico se realizó en el Laboratorio de Histología

del CIBNOR y para los análisis de las laminillas histológicas, toma de fotografías se utilizó el programa Q-Capture Pro7™ (QImaging® 2013).



## 7. RESULTADOS

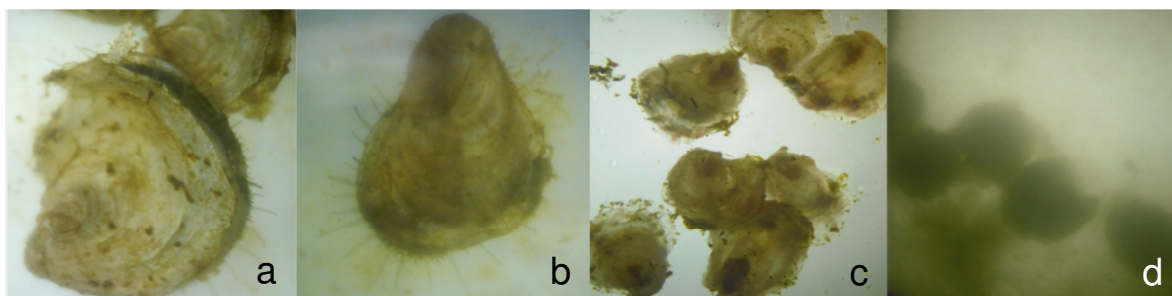
Esta sección se presenta partiendo de cada uno de los objetivos específicos, de tal forma que se presentará al inicio de cada sección según corresponda.

- 1) Identificar y analizar niveles de expresión de genes relacionados con el metabolismo en juveniles (3-5 mm) de *C. gigas*, como respuesta al efecto de una exposición aguda y subcrónica a *P. lima* mediante RT-PCR y qPCR.

### 7.1 Respuesta en la alimentación y tasas de aclaramiento

*C. gigas* (3-5mm) demostró cambios inmediatos en su comportamiento al ser expuesto al dinoflagelado tóxico *P. lima*. Estos cambios consistieron en el cierre parcial de valvas y en la producción de pseudoheces y moco (Figura 1). Durante el periodo de 0-3 h, los ostiones tratados con el dinoflagelado tóxico filtraron cantidades moderadas de células y presentaron cierre parcial de valvas, sin embargo, después de 6 h de exposición, los organismos parecían filtrar normalmente. En los TR2 y TR3 la turbidez del agua indicó que no hubo una remoción inmediata de las microalgas, sin embargo, transcurridas 24 h la clarificación del agua y la supervivencia de todos los organismos indicaron que su proceso alimenticio fue adecuado.

Es importante resaltar el 100% de supervivencia en todos los tratamientos durante las 336 h que duró el bioensayo, sin embargo, durante el periodo de depuración de 5 días posteriores al término del bioensayo, se observó un 100% de mortalidad de organismos expuestos a los TR2 y TR3, lo que indica que bajo estas condiciones el daño bioquímico-fisiológico es irreversible.

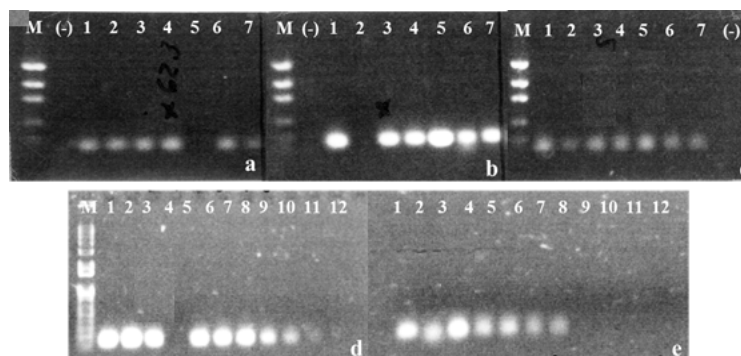


**Figura 1.** Fotografías que muestran el comportamiento alimenticio de *C. gigas* durante el bioensayo. Paneles: (a) control, (b) TR1 ( $0.3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>), (c) TR2 ( $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) y (d) TR3 ( $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>). (Microscopio Reichart Stereo Star Zoom, 40X).

## 7.2 Análisis de estabilidad de los genes de referencia candidatos

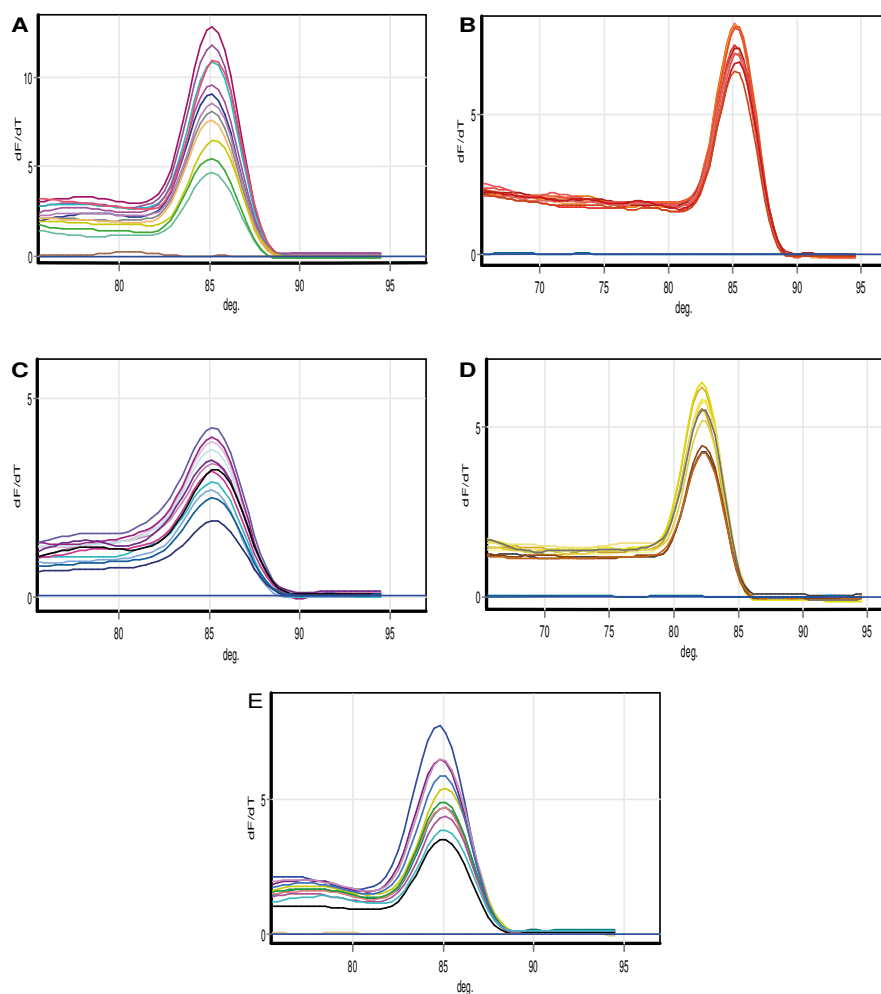
### 7.2.1 Amplificación por qPCR de genes de referencia candidatos

Se estudió el nivel relativo de expresión de cinco genes candidatos de referencia (*tub*, *ef1- $\alpha$* , *act*, *gapdh* y *28s*) en juveniles (3-5 mm) de ostión del Pacífico expuestos a células de *P. lima*. Los valores de Ct se distribuyeron entre 22.5 (*28s*) y 28.29 (*gapdh*) y los valores de Ct entre repeticiones fueron menores que uno. Las curvas estándar exhibieron coeficientes de correlación ( $R^2$ ) mayores a 0.98 y las eficiencias (E) del qPCR varió de 94% a 100% (Tabla V). La especificidad de la amplificación se confirmó mediante el análisis de las curvas de disociación (Figura 3). Las curvas de disociación (para todos los genes) mostraron un solo pico confirmando que la amplificación de los genes es específica. Por otro lado, también los análisis electroforéticos mediante gel de agarosa mostraron una sola banda en todos los casos a través de un gradiente de temperatura 60-68°C (Figura 2).



**Figura 2.** Perfil de tamaño de aplicones para validación de genes de referencia en gel de agarosa/Synergel al 1% en TBE 1X. Mezcla de ADNc de *C. gigas* a *P. lima*: (a) 28 S

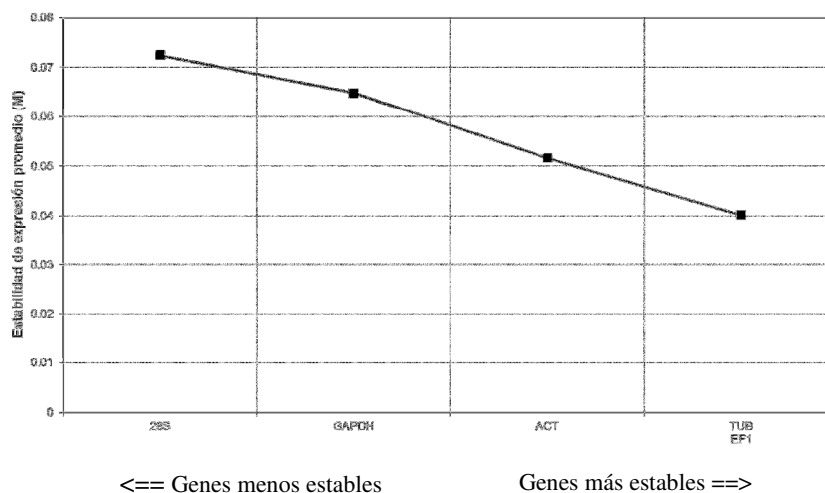
*ribosomal* (114pb) **(b)** *tubulina* (144pb) **(c)** *actina* (117pb) **(d)** *factor de elongación-1 $\alpha$*  (138pb) y **(e)** *gliceraldehido fosfato deshidrogenasa* (109pb). Líneas: 1, marcador de peso molecular (1 Kb plus Ladder); 1-7-12 muestras de una mezcla de ADNc. Técnica de tinción: EtBr; condiciones de separación, 80 V, 45 min, TA.



**Figura 3.** Curvas de disociación de genes de referencia candidatos. **(A)** *tub*, **(B)** *efl- $\alpha$* , **(C)** *act*, **(D)** *gapdh* y **(E)** *28s*.

### 7.2.2 Análisis de estabilidad por GeNorm

En la Figura 4 se muestra la estabilidad de la expresión (M) de cada gen de referencia candidato evaluado con GeNorm. De acuerdo a este análisis los genes más estables fueron *tub* (0.04) y *efl- $\alpha$*  (0.04) mientras que el gen menos estable fue el *28s* ribosomal (0.075), y la mejor combinación de dos genes fue *tub* y *efl- $\alpha$* .



**Figura 4.** Estabilidad de la expresión génica (M) de genes candidatos de referencia en *C. gigas* calculados con el software GeNorm. Un valor bajo de M indica la media de los genes más estables (n = 12).

### 7.2.3 Análisis de estabilidad por NormFinder

La variación entre grupos se midió al asignar categorías a las muestras (según el tratamiento y tiempo de exposición), de tal forma que el gen más estable es aquel cuyo valor se encuentra más cercano a cero. El gen que presentó mayor estabilidad comparado con 28s fue *tub* (Tabla VI). Por otra parte, los resultados de NormFinder mostraron que el mejor par de combinaciones de genes de referencia entre tiempo de exposición fue *tub* y *act* con un valor de 0.003 (Tabla VI), no encontrando variación significativa entre los grupos de tratamientos.

**Tabla VI.** Valores de estabilidad de los genes de referencia candidatos calculados con NormFinder.

| Nombre del gen   | Valores de estabilidad NormFinder ( <i>p</i> ) |  |
|------------------|--|--|
|                  | Variación intergrupala                         |  |
| <i>28s</i>       | 0.012  |  |
| <i>tub-β</i>     | 0.007 *  |  |
| <i>ef1-α</i>     | 0.009  |  |
| <i>gapdh</i>     | 0.010  |  |
| <i>act</i>       | 0.008*   |  |
| <b>Mejor par</b> | <b>0.003</b>                                   |  |

Nota: un gen de referencia ideal tiene una variación entre grupos tan cercana a cero como sea posible (n = 12). Valor de estabilidad para la mejor combinación de dos genes (mejor par). \* La mejor combinación de dos genes.

#### 7.2.4 Análisis de estabilidad por BestKeeper

Con el fin de comparar los resultados de los algoritmos GeNorm y NormFinder, los datos también se analizaron utilizando el método BestKeeper, que es independiente de clasificación. La estabilidad y el índice BestKeeper (*r* y los valores de *p*) son los dos criterios más importantes para evaluar la estabilidad de genes de referencia. En la Tabla VII se observa que *tub* (0.978), *gapdh* (0.940) y *28s* (0.890) son los genes con mayor correlación y, por tanto, los más estables y adecuados para la normalización de los datos.

**Tabla VII.** Análisis de correlación BestKeeper de muestras de *C. gigas* expuesto a *P. lima* (n=12).

|  | <i>28 s</i>   | <i>tubβ</i>   | <i>ef1-α</i> | <i>gapdh</i>  | <i>act</i> |
|--|---------------|---------------|--------------|---------------|------------|
| Coefficiente de correlación ( <i>r</i> ) | <b>0.890*</b> | <b>0.978*</b> | 0.860        | <b>0.940*</b> | 0.886      |
| Valor de <i>p</i>                        | 0.001         | 0.001         | 0.001        | 0.001         | 0.001      |

El coeficiente de correlación (*r*) y la medida del valor de *p* de la correlación entre cada gen y el índice de BestKeeper. \* Los genes más estables.

Con base en el consenso de los tres programas utilizados (GeNorm, NormFinder y BestKeeper), se decidió utilizar los genes *tub*, *28s* y *act*. Se descartó *gapdh* ya que puede ser inapropiado como gen de referencia interno debido a su variabilidad. Estos genes tampoco presentaron variación significativa en su nivel de expresión utilizando la técnica de RT-PCR semi-cuantitativo, además, *tubulina* y *actina* coinciden con uno de los genes más estables usando GeNorm y NormFinder.

El resto de los genes analizados con alguna significancia en su variación pero sin correlación para agruparlos en respuestas metabólicas específicas, se presentan en el Anexo I.

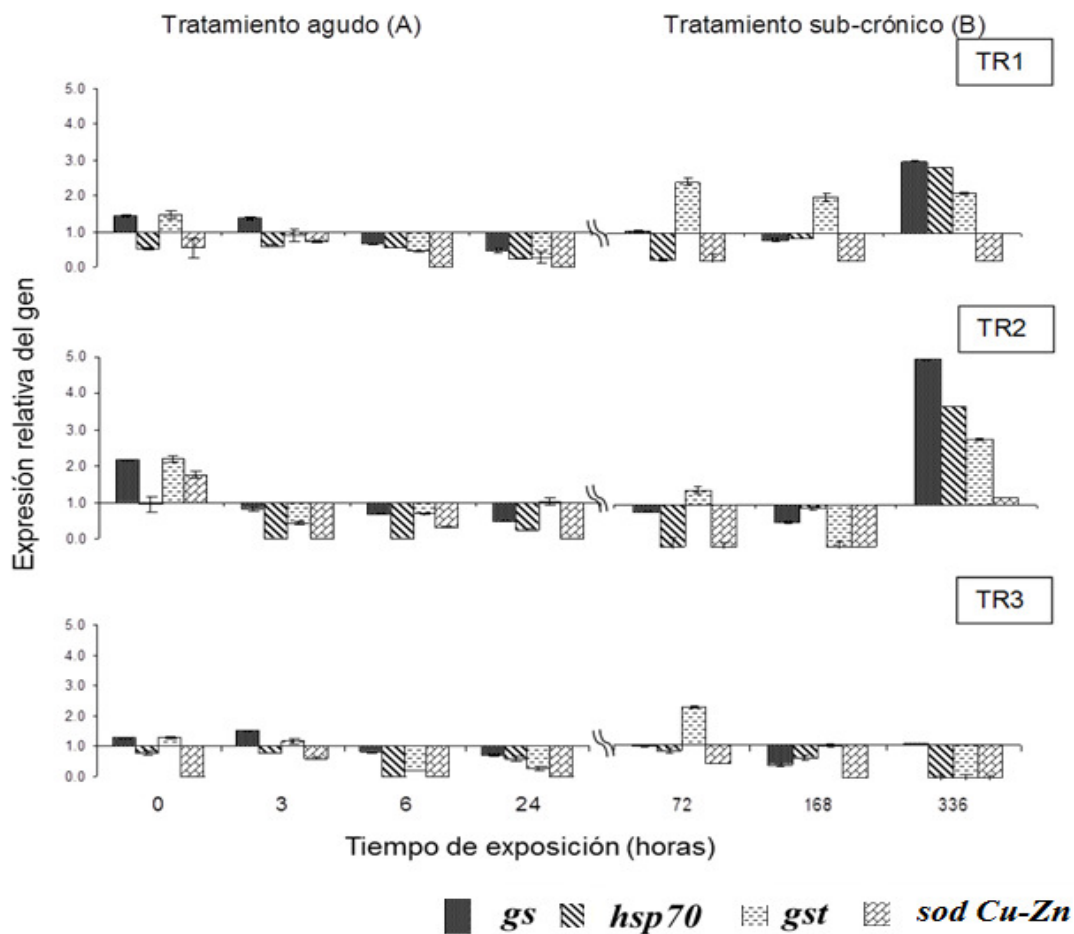
### 7.3 Análisis gen seleccionado mediante RT-PCR y qPCR

#### 7.3.1 Análisis de la expresión de proteínas de estrés mediante RT-PCR

Bajo las condiciones de ensayo en organismos de 3-5 mm, se observaron varios cambios en los niveles de expresión (respecto a sus condiciones basales) en los genes: *gs*, *gst*, *hsp70* y *sod Cu-Zn*. Estos cambios se muestran en forma gráfica en la (Figura 5).

En la mayoría de los genes se observó una respuesta de sobre-expresión a las cero (aguda) y 336 horas (subcrónica) de exposición al dinoflagelado tóxico, que fue particularmente notable en el TR2. En el TR1, el gen de *hsp70* se sobre-expresó a las 72 h de exposición y su tasa de transcripción se mantuvo de esa forma hasta el final del experimento (Figura 5).

El gen *gs* se sobre-expresó en los tres tratamientos (en relación al control) inmediatamente después de la adición de la dosis correspondiente de *P. lima* (0 h de exposición), posteriormente se sub-expresó desde las 6 h (exposición aguda) hasta las 168 h (exposición subcrónica). En los TR1 y TR2 se registró un marcado incremento en la expresión del gen *gs* a las 336 h de exposición a *P. lima*, mientras que en el TR3 se mantuvo reprimido sin variación significativa respecto al control (Figura 5).



**Figura 5.** Análisis RT-PCR semi-cuantitativo de la expresión de genes de respuesta generalizada a estrés, expresados en *C. gigas* expuesto a *P. lima*. La expresión génica se calculó considerando la condición basal de la expresión de cada gen (control) como 100%, haciendo la equivalencia a 1. Se encontraron diferencias significativas entre el control y las muestras tratadas con *P. lima* a  $0.3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> (TR1),  $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> (TR2) y  $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> (TR3). La expresión que se muestra en la figura en cada tratamiento de Glutamina Sintetasa (*gs*), Glutación-S-Transferasa (*gst*), Proteína de shock térmico 70 (*hsp70*) y Superóxido dismutasa tipo Cu/Zn (*sod-Cu-Zn*), es el residuo de la sustracción del valor del control correspondiente.

El gen *gst* mostró una sub-expresión dependiente tanto del tiempo de exposición como de la concentración del dinoflagelado, solamente a las 336 h se observó un aumento significativo en la expresión en los TR1 y TR2 (Figura 5).

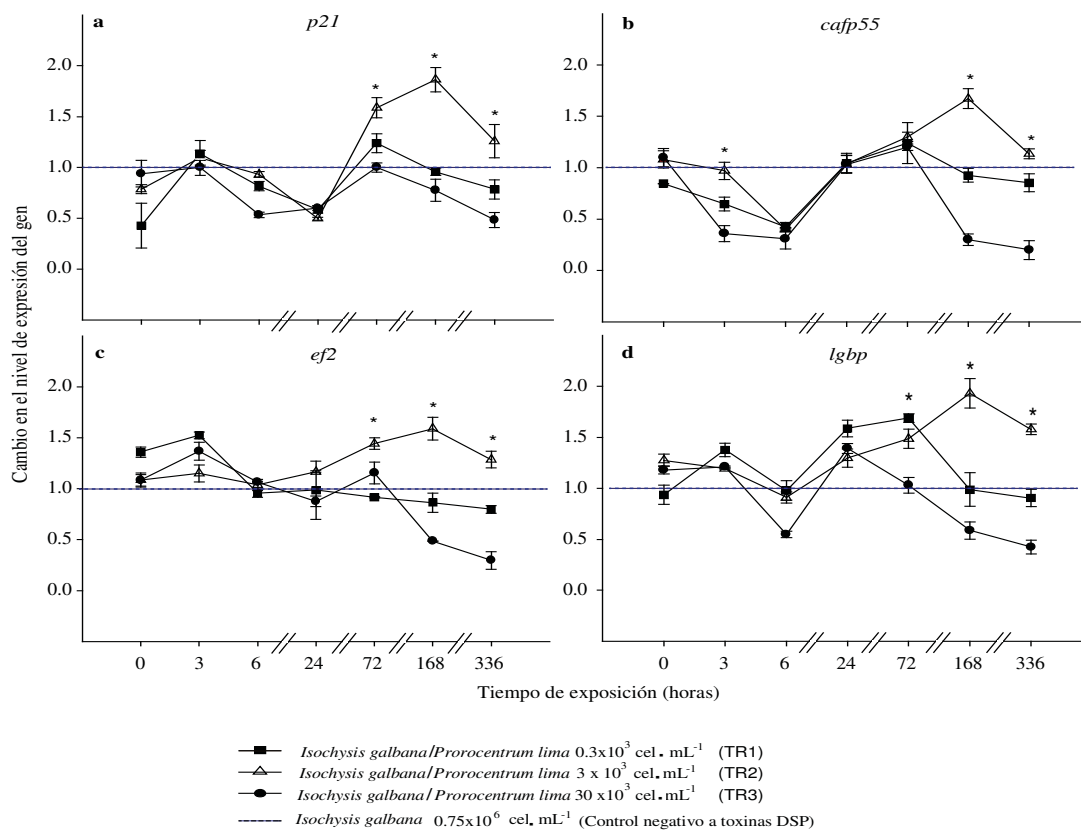
En términos generales, se observó que la exposición de *C. gigas* a *P. lima* causa sub-expresión del gen *sod Cu-Zn* independientemente del tiempo y la dosis de dinoflagelado (Figura 5, Tabla II), excepto para el TR2 (0 h), en la que el gen se sobre-expresa (en relación con el control), siendo esta condición estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

El análisis de genes involucrados en respuesta a estrés demuestra un claro efecto de la presencia de *P. lima* dosis-dependiente. El efecto de la exposición de *C. gigas* al dinoflagelado tóxico, sobre la expresión de genes de respuesta al estrés, fue más severo en TR2 ( $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> de *P. lima*), especialmente a las cero (tratamiento agudo) y 336 h (tratamiento subcrónico). La relación entre la expresión de los genes analizados y la dosis de *P. lima* fue débil con  $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> (TR3) a las 0 h y 336. La prueba *a posteriori* de Tukey (Tukey HSD) mostró que las variaciones en los patrones de expresión de genes (hacia arriba o hacia abajo) para los diferentes tiempos de exposición y las concentraciones de *P. lima* son más significativos cuando se comparan los datos de los organismos expuestos a las 0 h y 336 h. En resumen, las pruebas de significancia estadística para tratamientos agudos y subcrónico fueron  $F = 6.598$ ,  $p = 0.000$  y  $F = 3.44$ ,  $p = 0.000$ , respectivamente. En *C. gigas* expuesto a *P. lima* se encontraron diferencias significativas en la expresión cuando se compararon los datos del control, expuestos a *I. galbana* (microalga no tóxica) contra los organismos tratados. Se encontró una variación significativa en la expresión génica entre los grupos experimentales tiempo-dosis frente a los grupos basales (Figura 5).

### 7.3.2 Análisis de la expresión de genes de control de ciclo celular y de respuesta inmune

El análisis del impacto de la exposición de *C. gigas* a *P. lima* sobre las tasas de expresión de genes involucrados en la progresión del ciclo celular (*p21*, *cafp55*, *ef2*) y algunos genes de respuesta inmune (*lgbp*) se realizó en primer lugar a través de un examen de expresión semi-cuantitativo (RT-PCR) (Figura 6). Considerando





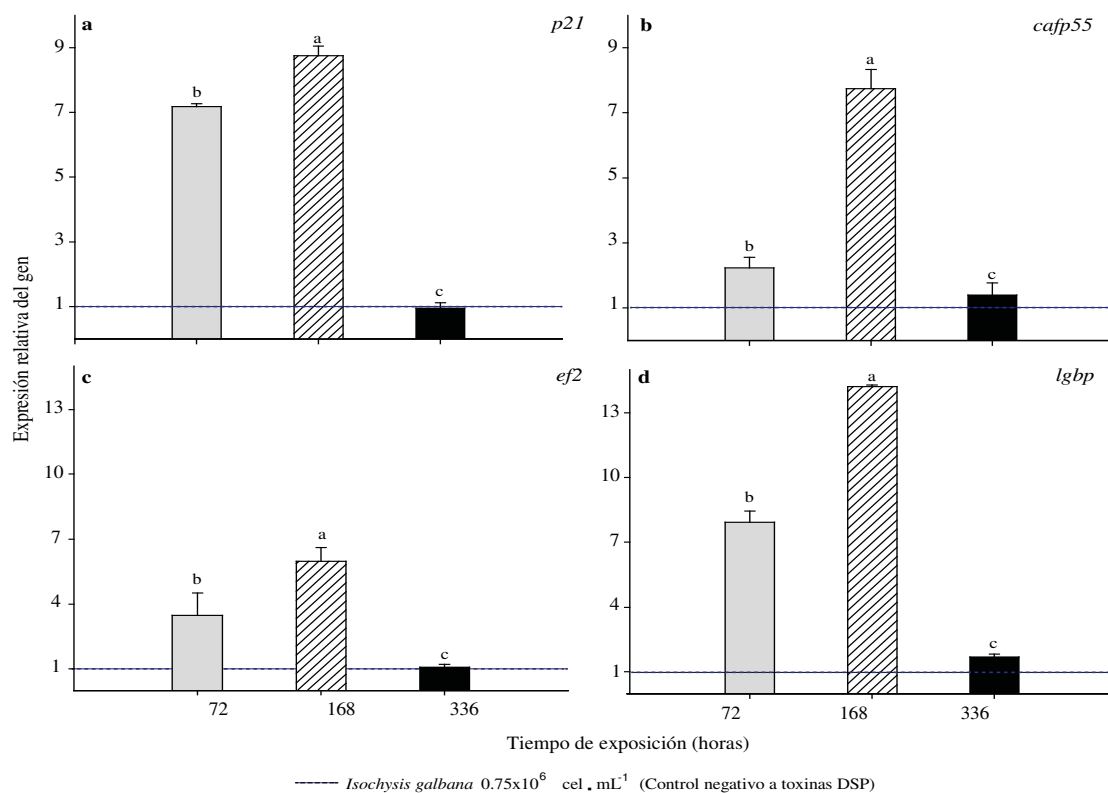
**Figura 6.** Análisis RT-PCR semi-cuantitativo de la expresión de genes relacionados con el ciclo celular y sistema inmunológico de *C. gigas* expuesto a *P. lima*. Paneles: a) *p21*, b) *cafp55*, c) *ef2* y d) *lgbp*. La expresión se calculó considerando la condición basal de la expresión de cada gen (control) como 100%, haciendo la equivalencia a 1. Las barras representan la desviación estándar (SD) a partir del valor medio de la intensidad de la fluorescencia para cada muestra, normalizado frente a valor de control (línea de puntos) (\*  $p < 0.05$ ).

estos resultados, se seleccionaron aquellos genes que mostraron desregulación y de los que posteriormente se realizó un análisis por qPCR considerando únicamente las muestras de la fase subcrónica (Figura 7); los resultados de ambas aproximaciones metodológicas (RT-PCR y qPCR) se analizaron como genes independientes.

Bajo condiciones normales, éste grupo de genes mostró una expresión constitutiva (su información es continuamente transcrita), sin embargo, se comportaron como inducibles bajo exposición subcrónica. El nivel de expresión de los genes *p21*, *cafp55* y *ef2* se incrementó significativamente en el TR2 ( $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>), y después de 72 h, y posiblemente como una respuesta compensatoria para el mantenimiento de la homeostasis, su tasa de expresión se modificó respecto al tiempo de exposición y su contacto con el dinoflagelado tóxico (Figura 6a, b y c). No obstante, el punto más alto de sobre-expresión (o desregulación) de estos genes se observó en el mismo tratamiento (TR2) a las 168 h.

La exposición prolongada de *C. gigas* a *P. lima* genera en el ostión condiciones metabólicas adversas que inician con una condición de estrés. Esto se confirma mediante la detección de bajos niveles de expresión tanto con RT-PCR (Figura 6a, b y c) como con qPCR (Figura 7a, b y c) a las 336 h de exposición, aunado a la observación posterior de la muerte de los organismos durante los 5 días posteriores al término del bioensayo (periodo de depuración, datos no mostrados).

Por otro lado, el nivel de expresión del gen *lgbp* mostró una variación significativa entre los tratamientos (TR1, TR2 y TR3) a partir de 72 h (Figura 6d). En el TR2 ( $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) el máximo pico de expresión se identificó a las 168 h de exposición; los niveles más bajos de transcripción de la *lgbp* suponen la supresión inmunológica de *C. gigas* bajo estas condiciones experimentales. En *C. gigas*, la exposición subcrónica a *P. lima* reduce la respuesta inmune, lo cual fue confirmado mediante la detección de bajos niveles de expresión por ambos métodos RT-PCR (Figura 6) y qPCR (Figura 7) a las 336 h de exposición.



**Figura 7.** Análisis qPCR de la expresión relativa de genes relacionados con la regulación del ciclo celular y respuesta inmune de *C. gigas* después de la exposición a TR2 (*I. galbana* 0.75 x10<sup>6</sup>/*P. lima* 3 x10<sup>3</sup> cel mL<sup>-1</sup>). Paneles: a) *p21*, b) *cafp55*, c) *ef2* y d) *lgbp*. Las barras representan la desviación estándar (SD) a partir del valor medio para cada muestra, normalizada con la *actina*, *tubulina* y *28S* (genes de referencia, Tabla V), y el valor relativo de calibrador (línea de puntos). Las letras diferentes minúsculas son diferencias significativas. (p <0.05).

#### 7.4 Bioensayo con *C. gigas* de talla (40-60 mm)

- 2) Determinar y cuantificar la expresión diferencial de genes en glándula digestiva por efecto de una exposición aguda y subcrónica a *P. lima* en juveniles (40-60 mm) de *C. gigas* mediante qPCR.

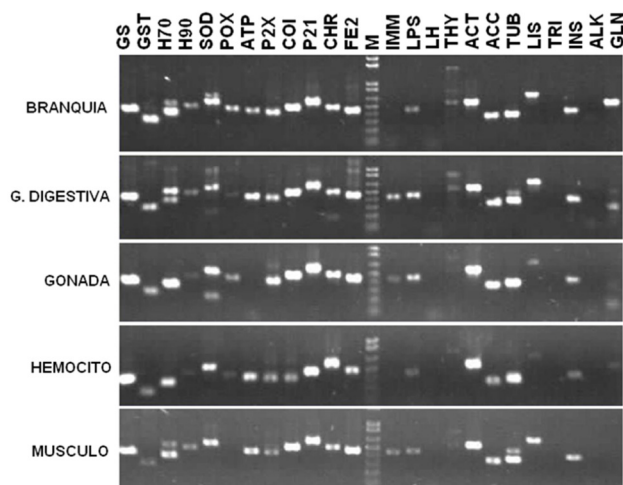
##### 7.4.1 Eficiencia de amplificación de oligonucleótidos diseñados para RT-PCR.

###### *Expresión tejido-específico*

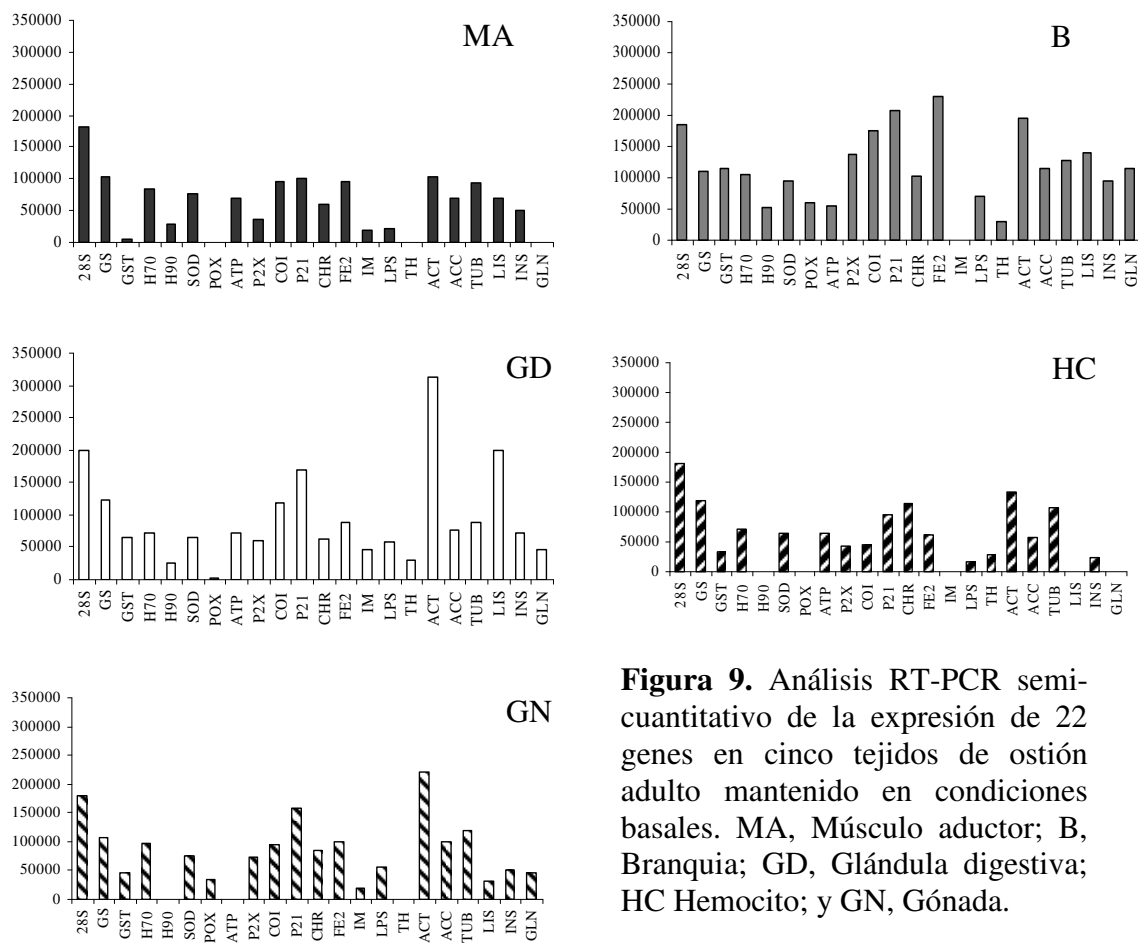
Los estudios de expresión génica son fundamentales para el conocimiento, a nivel molecular, de los mecanismos de señalización de reconocimiento mutuo y, en su caso, de la respuesta del ostión ante la presencia del dinoflagelado tóxico. Esta parte de la tesis fue realizada bajo el rigor metodológico del RT-PCR. Como primer paso se verificó el tamaño de los amplicones obtenidos al utilizar los oligonucleótidos dirigidos a los genes listados en la tabla III. Posteriormente se caracterizó la expresión tejido-específica, mediante RT-PCR, de los genes en estudio en organismos adultos mantenidos en condiciones basales (Tabla VIII, Figura 8). De los 25 genes analizados, solo tres no presentaron amplificación en los tejidos analizados (Tabla VIII); el resto de los genes mostraron una expresión tejido-específica. Tal es el caso de los genes que codifican proteínas de estrés y de cadena respiratoria, cuya expresión fue mayor en branquia que en hemocito. En cambio, los genes involucrados en el citoesqueleto, así como aquellos involucrados en la regulación de ciclo celular mantienen niveles de expresión altos en la mayoría de los tejidos analizados (Figura 9).

**Tabla VIII.** Relación de resultados de expresión de los genes en estudio en cinco tejidos de *C. gigas* adultos mantenidos en condiciones basales (por RT-PCR semi-cuantitativo).

| Gen  | Tejido       |                    |        |          |                 |
|--|--------------|--------------------|--------|----------|-----------------|
|  | Branquia     | Glándula digestiva | Gónada | Hemocito | Músculo aductor |
| Glutamina sintetasa (GS)                   | +            | +                  | +      | +        | +               |
| Glutación-S-transferasa (GST)              | +            | +                  | +      | +        | +-              |
| HSP <sub>70</sub> (H70)                    | +            | +                  | +      | +        | +               |
| HSP <sub>90</sub> (H90)                    | +            | +                  | +-     | -        | +               |
| CuZn-SOD (SOD)                             | +            | +                  | +      | +        | +               |
| Peroxidasa melanogénica (POX)              | +            | +-                 | +      | +-       | -               |
| ATP sintetasa beta (ATP)                   | +            | +                  | -      | +        | +               |
| P2X <sub>4</sub> canal iónico (P2X)        | +            | +                  | +      | +        | +               |
| Citocromo oxidasa (COI)                    | +            | +                  | +      | +        | +               |
| Proteína p21 (P21)                         | +            | +                  | +      | +        | +               |
| Sub. 1 del ass-factor p55 cromatina (CHR)  | +            | +                  | +      | +        | +               |
| Factor de elongación 2 (FE2)               | +            | +                  | +      | +        | +               |
| Inmunolectina B (IMM)                      | -            | +                  | +      | -        | +               |
| LPS- $\beta$ -1,3 glucano (LPS)            | +            | +                  | +      | +        | +               |
| Lectina hepática (LH)                      | No amplificó |                    |        |          |                 |
| $\beta$ -timosina (THY)                    | +            | +                  | -      | -        | -               |
| Actina (GIA) (ACT)                         | +            | +                  | +      | +        | +               |
| Actina citoplasmática A3 (ACC)             | +            | +                  | +      | +        | +               |
| Tubulina (TUB)                             | +            | +                  | +      | +        | +               |
| Lisozima (LIS)                             | +            | +                  | +-     | +-       | +               |
| Tripsina (TRI)                             | No amplificó |                    |        |          |                 |
| Inhibidor de proteinasas (Ser o Cys) (INS) | +            | +                  | +      | +-       | +               |
| Fosfatasa alcalina (ALK)                   | No amplificó |                    |        |          |                 |
| Glucanasa $\beta$ -1,3 (GLN)               | +            | +                  | +      | +        | -               |
| 28S ribosomal                              | +            | +                  | +      | +        | +               |



**Figura 8.** Perfil electroforético RT-PCR de 24 genes en 5 tejidos de *C. gigas* mantenidos en condiciones basales.



**Figura 9.** Análisis RT-PCR semi-cuantitativo de la expresión de 22 genes en cinco tejidos de ostión adulto mantenido en condiciones basales. MA, Músculo aductor; B, Branquia; GD, Glándula digestiva; HC Hemocito; y GN, Gónada.

#### 7.4.2 Perfil de expresión de genes relacionados con citoesqueleto (2) y proceso inflamatorio (1) en glándula digestiva

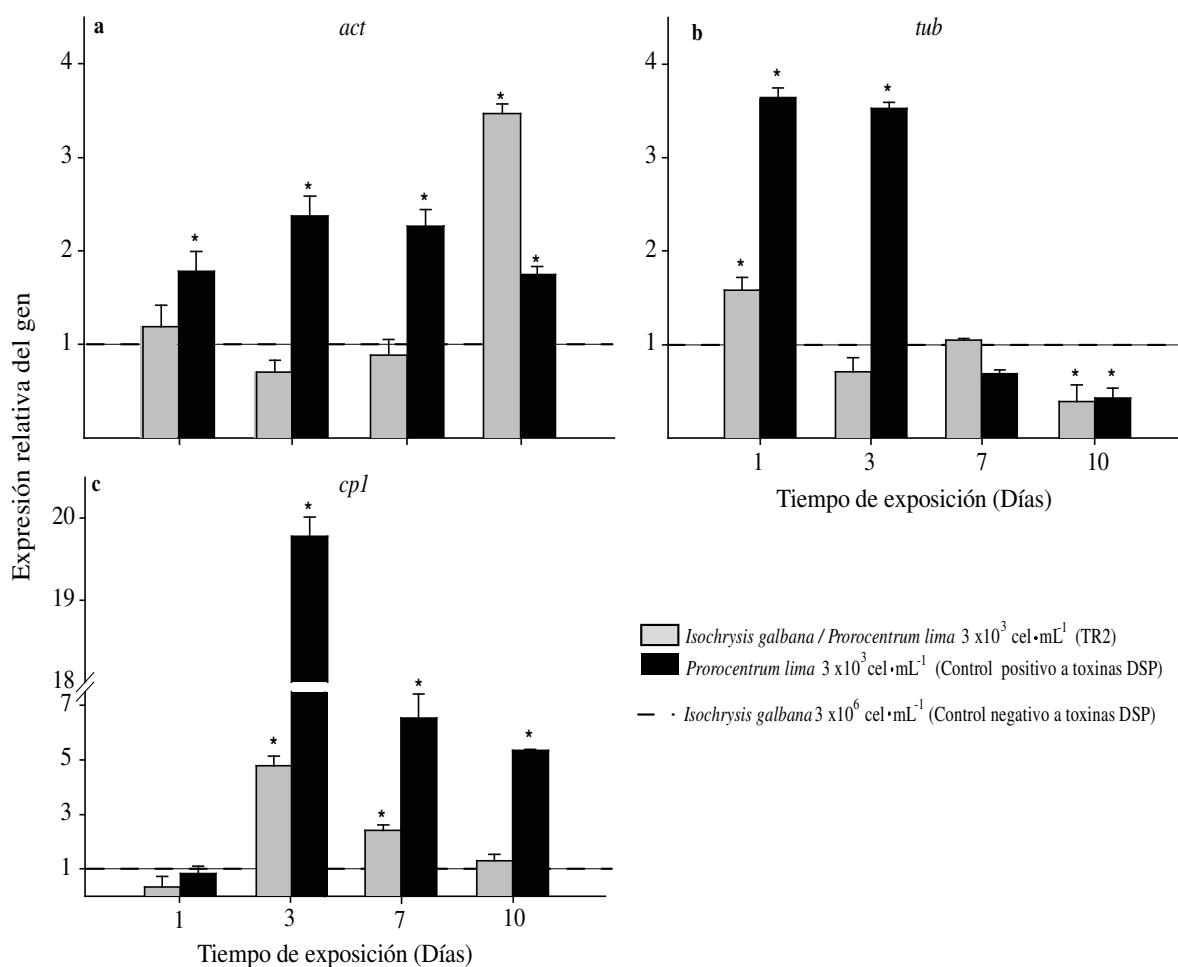
Una vez identificado que los amplicones determinados correspondían a los esperados (sección 7.4.1), y considerando la participación de glándula digestiva como órgano blanco para las toxinas DSP se decidió dar seguimiento a este tejido a nivel molecular y tener un mejor entendimiento de la respuesta metabólica del ostión.

El impacto de *P. lima* sobre *C. gigas* fue estudiado evaluando los cambios en las tasas de expresión de siete genes involucrados en 3 procesos celulares importantes: 1) citoesqueleto, en el que se consideraron los genes que codifican la Actina (*act*) y la  $\beta$ -Tubulina (*tub*); 2) Inflamación y apoptosis, en el que se consideró la Caspasa 1 (*cp1*) y 3) genes involucrados en el control del ciclo celular, los factores proteicos *p21*, *p55*, *p53* y el factor de elongación 2 (*ef2*). Los niveles de transcripción de estos genes se determinaron en glándula digestiva de juveniles de *C. gigas* de 40-60 mm. El gen *ef1- $\alpha$*  fue utilizado para normalizar el nivel de los transcritos ya que no se observaron diferencias significativas en el nivel de expresión de este gen entre los organismos sin tratamientos y los tratados durante los 10 días que duró el experimento. Se descartaron *actina* y *tubulina* debido a que presentaron variación significativa en glándula digestiva y se decidió considerar sólo un gen para normalizar los datos de expresión. El gen *act* exhibió un bajo nivel de expresión durante los primeros 7 días del tratamiento TR2, no mostrando diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (línea punteada). Sin embargo, a los 10 días se observó un incremento en la expresión 2.5 veces mayor que el control ( $p < 0.05$ ), lo que implica que el número de transcritos se incrementa con el tiempo de exposición a *P. lima* (Figura 10a). Por otro lado, durante la exposición subcrónica al control positivo (sólo *P. lima* a una concentración de  $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) la sobre-expresión de *act* inducida por la presencia del dinoflagelado a partir de las 24 h de exposición, se mantuvo con significancia estadística hasta el día 10 (Figura 10a). El gen *tub* únicamente mostró sobre-expresión estadísticamente significativa a las 24h de exposición al TR2 y, posteriormente, a los 10 días disminuyó al nivel de transcripción del control negativo ( $p < 0.05$ ) (Figura 10b). No obstante, se observó un incremento estadísticamente significativo en la transcripción del

gen *tubulina* (3 veces,  $p < 0.05$ ) a las 24 y 72 h de exposición al dinoflagelado sólo (control positivo) (Figura 10b).

Estos resultados revelan que la expresión de los genes de *act* y *tub* está modulada tanto por la presencia de *P. lima* así como por el tiempo de exposición al dinoflagelado. El gen *cp1* se sobre-expresó 5 y 2 veces más en el TR2 que el control negativo ( $p < 0.05$ ) en los días 3 y 7 respectivamente (Figura 10c). En este caso el efecto ocasionado por *P. lima* sobre *C. gigas* en la transcripción de *cp1* es claramente identificado. Adicionalmente, se observó una sobre-expresión severa (19 veces mayor que en el control negativo,  $p < 0.05$ ) a los 3 días de exposición, así como una sobre-expresión sostenida durante los días 7 a 10 en el control positivo *P. lima* (Figura 10c).





**Figura 10.** Análisis qPCR de la expresión de genes relacionados con citoesqueleto y proceso inflamatorio en glándula digestiva de *C. gigas* después de la exposición a *P. lima*. Paneles: a) actina (*act*), b)  $\beta$ -tubulina (*tub*) y c) caspasa 1 (*cp1*). Las barras representan la desviación estándar (SD) a partir del valor medio para cada muestra, normalizada con EF1 $\alpha$  (gen de referencia), y el valor relativo de calibrador (línea de puntos); (p < 0,05, asterisco) son diferencias significativas.

#### 7.4.3 Perfil de expresión de genes relacionados con síntesis proteica (1) y regulación del ciclo celular (3) en glándula digestiva.

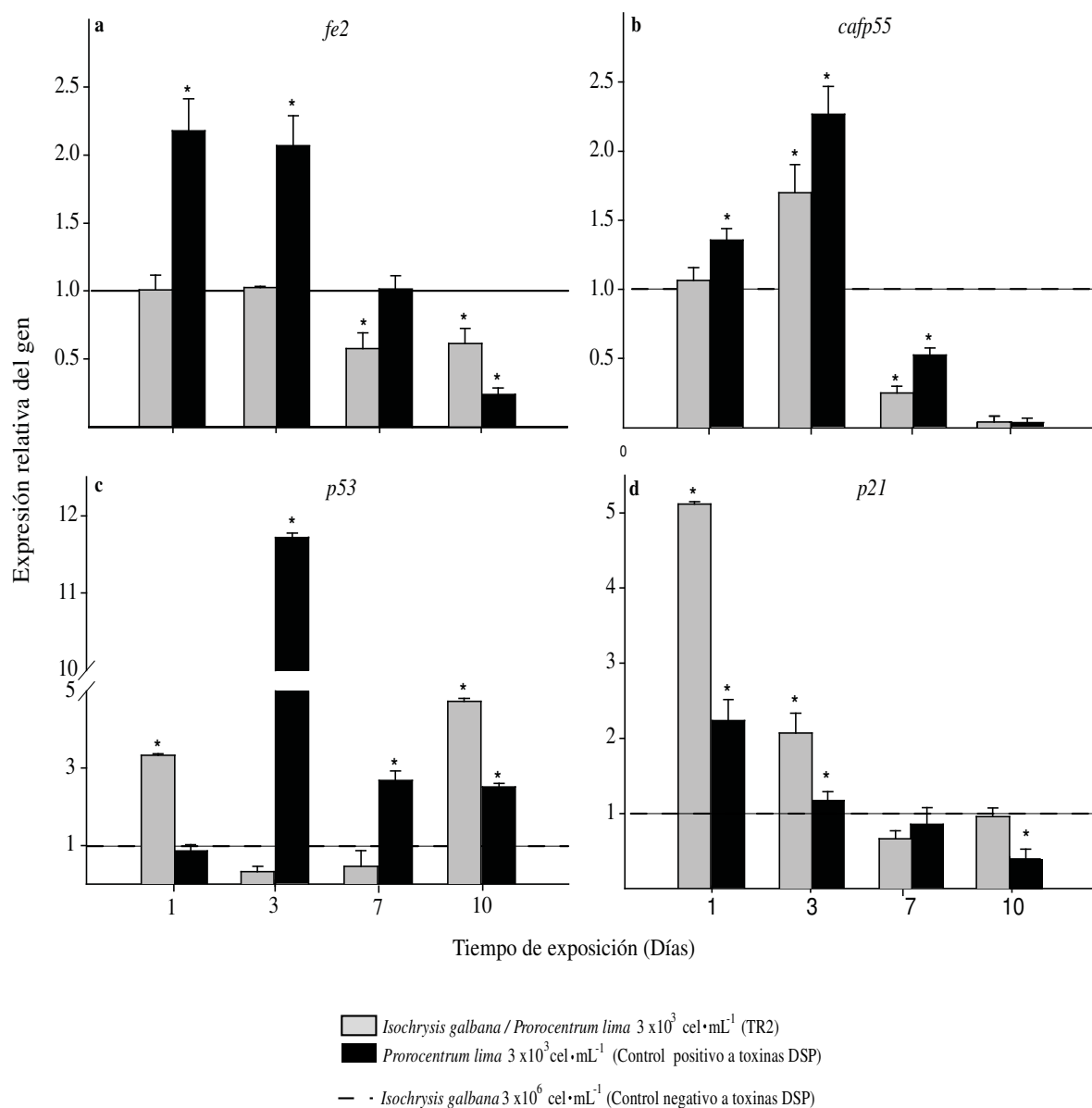
Los organismos expuestos al tratamiento TR2 exhibieron un bajo nivel de transcripción del gen *ef2*, en los que una represión de la transcripción estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) se identificó a los 7 y 10 días de exposición (Figura 11a). En el control positivo, se observó una franca sobre-expresión del gen *ef2* a los 1 y 3 días de exposición ( $p < 0.05$ ), sin embargo, a los 10 días de exposición el nivel de transcritos disminuyó al grado de considerarse como subexpresión (Figura 11a).

Para identificar el efecto de la exposición de *C. gigas* al dinoflagelado tóxico en términos de la regulación del ciclo celular y de esta forma entender la posible correlación sobre el efecto genotóxico del AO producido por *P. lima*, se cuantificó el nivel de transcripción de genes que participan en puntos claves de control y reparación del daño dentro de la progresión del ciclo celular.

En el caso de los genes *cafp55* y *p21*, el efecto del TR2 fue sobre-expresión en los días 1 y 3 del bioensayo y sub-expresión en los días 7 y 10 (Figura 11b y d). Por otro lado, en el gen *cafp55* se observó un comportamiento similar en los organismos del control positivo (sólo el dinoflagelado), en el que el nivel máximo de transcripción se observó a los 3 días de exposición, mientras que a los 10 días no se detectó expresión (Figura 11b). Por otra parte, se observó sobre-expresión de *p21* en el control positivo a las de 24 h de exposición (1.5 veces superior al control) pero conforme se desarrolló el bioensayo (días 3, 7 y 10) fue disminuyendo paulatinamente (Figura 11d). Los organismos bajo el TR2 presentaron sobre-expresión de *p53* 24 h posteriores al inicio del bioensayo: el valor más alto de expresión se observó a los 10 días (4 veces,  $p < 0.05$ ) (Figura 11c). En los días 3 y 7 se observó cierto grado de sub-expresión, sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Un incremento significativo de *p53* se identificó en el control positivo (sólo *P. lima*) en el día 3 (10 veces,  $p < 0.05$ ), disminuyendo en el día 7 (pero aún 2 veces por arriba del control) y sosteniéndose hasta el día 10 (Figura 11c).

Estos resultados revelan que la expresión de los genes asociados a la estabilidad del citoesqueleto, señalamiento apoptótico y de daño celular por desregulación del ciclo celular en glándula digestiva de *C. gigas* fue modificada por la presencia de *P. lima*, y que estos

cambios se pueden correlacionar con la presencia de la toxina en el dinoflagelado. Además, la magnitud de la respuesta está fuertemente correlacionada con el tiempo de exposición ( $p < 0.05$ ).



**Figura 11.** Análisis qPCR de la expresión de genes relacionados con la síntesis de proteínas y la regulación del ciclo celular en glándula digestiva de *C. gigas* expuesto a *P. lima*. Paneles: a) factor de elongación 2 (*ef2*), b) *cafp55*, c) *p53* y d) *p21*. Las barras representan la desviación estándar (SD) a partir del valor medio para cada muestra, normalizada con *ef1 $\alpha$*  (gen de referencia), y el valor relativo de calibrador (línea de puntos); ( $p < 0,05$ , asterisco) son diferencias significativas.

#### 7.4.4 Comportamiento de alimentación en *C. gigas*

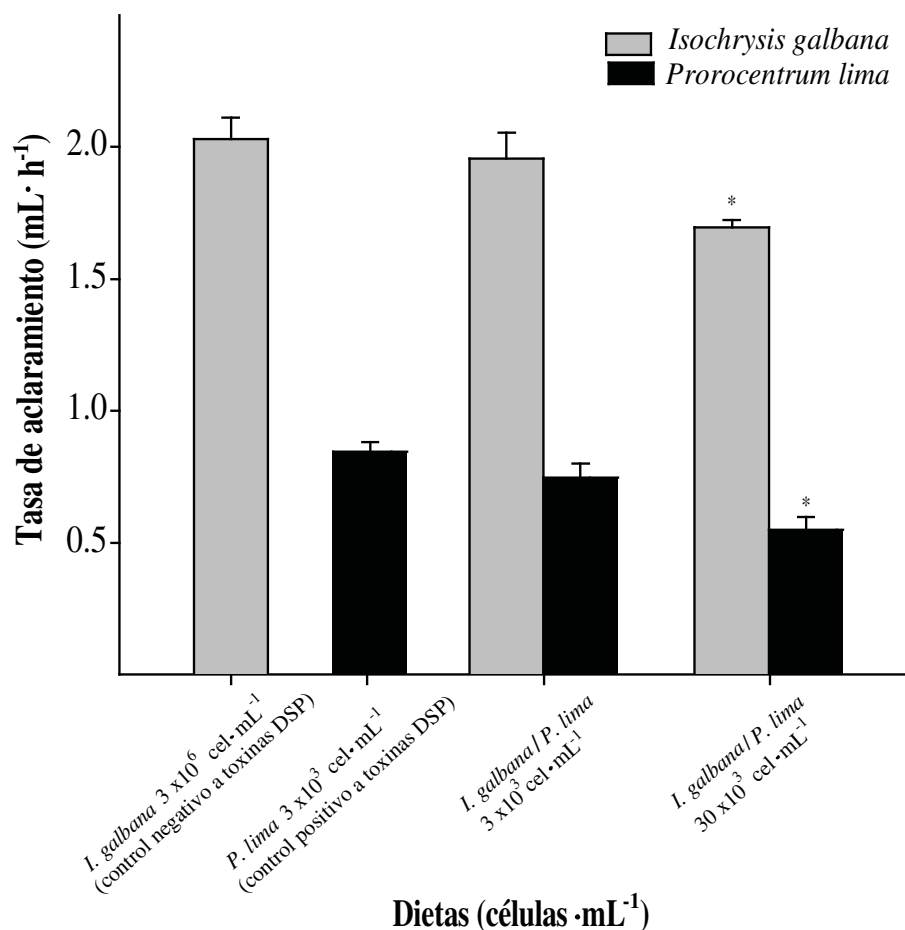
Los ostiones tratados mostraron cambios inmediatos en su comportamiento alimenticio después del primer contacto con *P. lima*. Durante las dos horas siguientes al inicio del bioensayo, los organismos mostraron un cierre parcial de valvas con las dietas mezcladas *I. galbana* +*P. lima* (3 y  $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>; TR2 y TR3, respectivamente) y con la dieta de sólo *P. lima* (control positivo para la toxina). Posteriormente, estos mismos organismos (TR2, TR3 y control positivo) produjeron pseudoheces activamente (datos no mostrados), y después de las 6 h comenzaron a filtrar el alimento normalmente, principalmente el TR2 ( $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>).

Los ostiones alimentados únicamente con *I. galbana* (control negativo) mostraron un comportamiento de filtración normal al remover la microalga durante todo el bioensayo. Este análisis tuvo como objetivo monitorear la tasa de aclaramiento (TA) de los ostiones en exposiciones unialgales (controles positivo y negativo), así como determinar mediante la TA la capacidad de filtración de cada una de las especies proporcionadas en las dietas mixtas (*I. galbana* + *P. lima*)

En la Figura 12 se muestran las TA de *C. gigas* bajo diferentes dietas después de 24 h de iniciado el bioensayo (exposición aguda). Los organismos del control negativo (solo *I. galbana*) mostraron una TA de  $2 \pm 0.08$ , los del TR2 mostraron una TA constante (para *I. galbana*), similar al control negativo, mientras que en los organismos con el TR3 la TA para *I. galbana* disminuyó significativamente a 1.75 (ANOVA,  $p < 0.05$ ). Por otra parte, en los organismos del control positivo para la toxina (sólo *P. lima*) la TA de *P. lima* disminuyó significativamente a  $0.84 \pm 0.03$ , con el TR2 la TA disminuyó a  $0.75 \pm 0.05$ , mientras que con TR3 la TA disminuyó a  $0.55 \pm 0.04$  siendo este último cambio estadísticamente significativo (ANOVA,  $p < 0.05$ ). Es importante destacar que la TA del control positivo (dieta sólo *P. lima*) fue similar al TR2 ( $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> de *P. lima*)

Los ostiones alimentados con el dinoflagelado (control positivo y tratamientos) mostraron una baja actividad de alimentación en comparación con los alimentados con la microalga no tóxica (Figura 12). A las 24 h, los ostiones alimentados con *I. galbana* habían consumido por completo a las microalgas, mientras que los alimentados con dinoflagelados

tóxicos no; no se registró muerte de organismos en las condiciones experimentales empleadas.



**Figura 12.** Tasa de aclaramiento de *Crassostrea gigas* alimentados con *Prorocentrum lima* y/o *Isochrysis galbana*. El asterisco indica diferencias significativas después de 24 h de exposición entre el control negativo y los tratamientos ( $p < 0.05$  en LSD de Fisher).

#### 7.4.5 Alteraciones histológicas en *C. gigas*

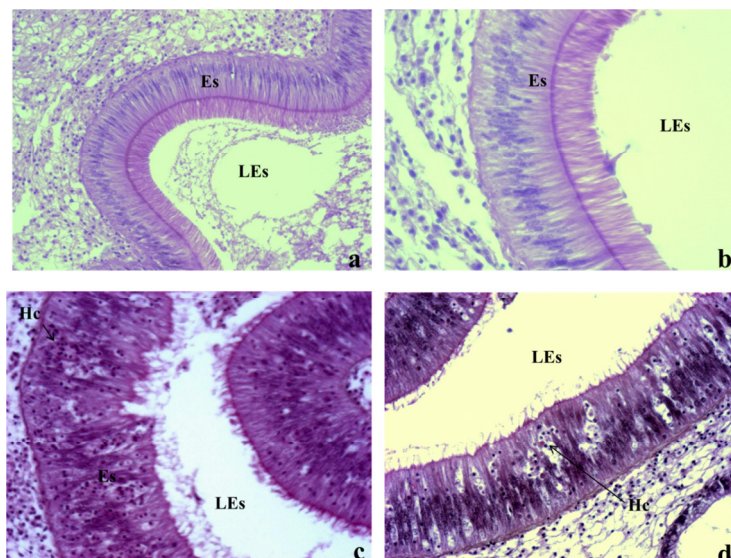
Para determinar la existencia y/o nivel de daño en algunos órganos de *C. gigas* expuesto a *P. lima*, se realizaron análisis histológicos de estómago y de glándula digestiva. Para este análisis los organismos seleccionados fueron los de los controles: a) negativo, alimentado sólo con *I. galbana*, y b) positivo, alimentados sólo con *P. lima*.

Estómago: el epitelio del estómago consiste de una sola capa de células epiteliales ciliadas y no ciliadas expuesto sobre una lámina basal. En la Figura 13 se observa en los paneles superiores parte del estómago (Es) de un ostión alimentado con la microalga *I. galbana* (control negativo), en el que no se identifica daño epitelial (Es), la capa de células epiteliales está intacta y los cilios que rodean al epitelio por dentro del lumen del estómago (LEs) aparecen sin alteración (Figura 13a y b). Por otro lado, en los paneles inferiores (Figura 13c y d) que corresponden a secciones de estómago de ostiones alimentados sólo con *P. lima* (control positivo) se observan claramente repliegues en el epitelio, lo que resulta en la formación de espacios dentro del mismo. Además, se observó penetración (infiltración) de hemocitos (Hc) desde el espacio intersticial hacia el epitelio intestinal y el lumen del estómago. Por tanto, es claro el daño a nivel celular en los tejidos de los ostiones expuestos al dinoflagelado; también se observó inflamación así como la pérdida de las vellosidades del epitelio.

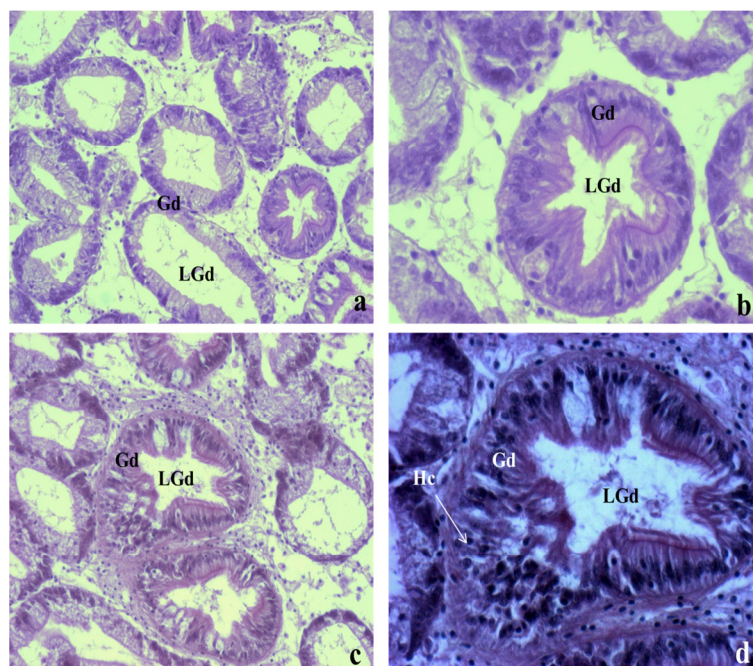
La glándula digestiva o hepatopáncreas: es una masa compacta que rodea al estómago y a gran parte del intestino. De acuerdo a Elston (1999), durante la alimentación, las partículas son seleccionadas en el estómago a través de ductos/conductos primarios que se ramifican en múltiples conductos secundarios que finalizan en masas de túbulos ciegos o divertículos digestivos. Los conductos digestivos presentan una forma externa redondeada con una luz o lumen irregular con entrantes y salientes (forma de estrella), con un epitelio constituido por una zona ciliada y otra no ciliada. Los túbulos digestivos están formados por dos tipos celulares fácilmente diferenciables: las células digestivas columnares con un sistema lisosómico digestivo muy desarrollado que participan en la digestión intracelular del alimento, y las células basófilas triangulares, con abundante retículo endoplásmico rugoso y relacionadas con la síntesis de proteínas. En la figura 14a y b se muestra la glándula digestiva de un ostión alimentado con solamente con *I. galbana* en donde se puede observar la forma normal estrellada del lumen de la glándula. En estos paneles (14 a y b) es evidente la anatomía normal de la glándula pues no se observa daño en el epitelio ni pérdida en la zona ciliada. En contraste, en la Figura 14 paneles c y d se identifica fácilmente el daño en la glándula digestiva de ostiones expuestos a *P. lima*. Se observa adelgazamiento y pérdida

de la integridad del epitelio que rodea la glándula digestiva, así como la ruptura de la zona ciliada de algunos divertículos digestivos, además de una severa infiltración de hemocitos.





**Figura 13.** Histopatología de secciones transversales de estómago de *C. gigas* alimentado con *I. galbana* (control negativo) a 200x (a) y 400x (b) aumentos, y con *P. lima* (control positivo) a 200x (c) y 400x (d) aumentos. **Es**, estómago; **LEs**, lumen del estómago; y **Hc**, hemocitos. Técnica de tinción: HE.



**Figura 14.** Histopatología de secciones transversales de glándula digestiva de *C. gigas* alimentado con *I. galbana* (control negativo) a 200x (a) y 400x (b) aumentos, y con *P. lima* (control positivo) a 200x (c) y 400x (d) aumentos. **Gd**, glándula digestiva; **LGd**, lumen de la glándula digestiva; y **Hc**, hemocitos. Técnica de tinción HE.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Bioensayo de *C. gigas* de talla 3-5 mm

#### 8.1.1. Respuesta de *C. gigas* en la alimentación

De acuerdo a los resultados obtenidos, la exposición al dinoflagelado tóxico *P. lima* representa una fuente de estrés para los ostiones, ya que mostraron como estrategias para aumentar su capacidad de adaptación a una alta concentración de células en el ambiente, un aumento de su tasa de filtración y/o la producción de pseudoheces. En otros estudios se ha demostrado que la capacidad de adaptación ingestiva de los ostiones, como la producción de pseudoheces, es un mecanismo pre-ingestivo relevante, ya que a través de él no sólo se evita exceder la capacidad de ingestión, sino también se facilita el proceso de selección de partícula por el que las partículas nutritivas menores pueden ser rechazadas resultando en una mejora proporcional de la calidad de material (Cognie et al., 2001; Beninger et al., 1999). Los estudios de rastreo de la viabilidad en el tracto digestivo, la cuantificación de los niveles de incorporación y la determinación de las tasas de consumo, han demostrado que las toxinas DSP se acumulan en los tejidos de algunas especies de bivalvos, por ejemplo, el 76% de las toxinas DSP se encontraron acumuladas en glándula digestiva (Bardovil et al., 1993; Bauder y Cembella, 2000; Bauder et al., 2001). En otros estudios realizados por nuestro grupo, se demostró que bajo exposición aguda (24 h) *C. gigas* responde con la formación de pseudoheces (López Cuevas, 2013) y en términos de respuesta generalizada a estrés, la expresión de ciertos genes clave demostró ser tiempo-dosis-dependiente a la presencia de *P. lima* (Anexo II).

#### 8.1.2 Análisis de la expresión de genes de proteínas de estrés mediante RT-PCR

La respuesta celular al estrés oxidativo en las células eucariotas ha sido una herramienta muy valiosa para investigar los mecanismos y la dinámica de la expresión génica inducida (Lindquist, 1986). En el metabolismo celular aeróbico normal, el oxígeno se utiliza para diversas reacciones bioquímicas; sin embargo, genera especies reactivas de oxígeno (EROs) que tienen una fuerte reactividad y potencialmente pueden interactuar con otros componentes celulares (lípidos, proteínas, ácidos nucleicos). Las EROs originan

reacciones de oxidación en cadena, donde las enzimas antioxidantes juegan un papel importante como medida de protección al daño celular (Manduzio et al., 2005). Las enzimas antioxidantes son utilizadas como biomarcadores de respuesta tóxica en los vertebrados, pero el impacto de toxinas marinas en moluscos y su acumulación a través de una respuesta genotóxica ha sido poco estudiada (Carvalho Pinto-Silva et al., 2005). Es bien sabido que los moluscos cuentan con un mecanismo de protección celular dado por el sistema antioxidante, con la participación de proteínas tales como Glutación-S-transferasa, proteína de shock térmico 70, glutamina sintetasa, superóxido dismutasa tipo Cu-Zn y catalasa que aumentan sus niveles de expresión; por ejemplo, en *C. gigas* como una respuesta ante factores de estrés ambiental y/o químico (Hamdoun et al., 2003; Tanguy et al., 2003; Boutet et al., 2004b; David et al., 2005; Tanguy et al., 2005; Farcy et al., 2008a). Existe mucha información publicada sobre el comportamiento y la respuesta fisiológica de varias especies de bivalvos expuestos a algas tóxicas y del papel de las enzimas antioxidantes como la primera línea de defensa celular (Manduzio et al., 2005; Hégarret et al., 2007; Tran et al., 2010). Sin embargo, a nivel molecular, la expresión de genes de respuesta a estrés generado por florecimientos algales nocivos (FAN) no está bien documentada. En este trabajo se emuló una condición simplificada de los bivalvos expuestos a FAN en su ambiente natural, con el fin de aislar y combinar los dos principales factores que consideramos pueden afectar en mayor grado la salud de los organismos: tiempo de exposición y la concentración celular del dinoflagelado tóxico. Al considerar que el tiempo de exposición en un evento FAN es variable (puede oscilar de horas a días, llegando incluso hasta los 100 días), se establecieron dos escenarios de exposición: (1) exposición aguda ( $\leq 24$  h), con el fin de obtener información acerca de la respuesta inmediata de los organismos en presencia del dinoflagelado tóxico, y (2) exposición subcrónica ( $> 24$  h,  $< 15$  días), en la que se pretendió determinar el efecto acumulado en un escenario de un evento de larga duración.

En el ambiente natural la duración de estos eventos está directamente influenciada por el clima y las condiciones hidrográficas (Anderson, 2007). Por otra parte, se ha encontrado que la concentración normal de *P. lima* en el mar es de alrededor de 1 a 2 cel mL<sup>-1</sup> y puede alcanzar hasta 30 o 40 cel mL<sup>-1</sup> sin causar efecto aparente (Bauder et al., 2001). No

obstante, en un evento de FAN la concentración de células puede oscilar entre 500 a 1000 cel mL<sup>-1</sup>, pudiendo causar la discoloración del agua y, por tanto, los efectos patológicos que se mencionaron anteriormente. De estos, el más simple es la anoxia, pero cuando el evento implica especies tóxicas y sucede la incorporación de las toxinas en la cadena trófica, en los casos más extremos suceden mortalidades masivas de organismos como moluscos, crustáceos, peces, aves y mamíferos marinos (Zingone y Enevoldsen, 2000). Al considerar la concentración celular como una variable, los escenarios planteados fueron: (1) una baja concentración (TR1) en la que se observó un efecto débil; (2) una concentración que produjo la discoloración del agua (TR2), y (3) una concentración alta ( $30 \times 10^3$ , TR3) en la que se observaron efectos claros, correspondiendo con los reportes de que la concentración celular pueden causar muertes masivas de organismos en el ambiente (Hallegraeff, 1995, Álvarez-Cárdenas, 2009). Por tanto, se consideró un estudio en condiciones de laboratorio, para determinar la respuesta génica de *C. gigas* expuesto a *P. lima* a través de un análisis comparativo de la expresión de cuatro genes de respuesta al estrés en los dos escenarios de tiempo de exposición y tres concentraciones celulares de dinoflagelados tóxicos (Figura 5). En el 2008(a), Farcy et al. observaron que las HSP muestran respuestas fuertes a través de cambios en los niveles de ARNm en ostiones estresados por calor, lo que confirma que la familia HSP está implicada en la respuesta celular a muchos factores de estrés ambientales y fisiológicos. La HSP70 es una proteína que interactúa con diversas proteínas-sustratos participando en el plegamiento de proteínas, jugando un papel crítico durante el estrés celular. A su vez, las quinasas regulan la función de las HSP, caspasas y otras proteínas que participan en eventos de remodelación durante la replicación de los cromosomas y cambios en la estructura celular y, por tanto, están relacionados con el crecimiento celular. En *C. gigas* se observó una respuesta inmediata de sobre-expresión de *hsp70* en los TR1 y TR2 ( $0.3 \times 10^3$  y  $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> de *P. lima*, respectivamente), pero posteriormente (3 a 24 h) se observó una disminución de la expresión. En nuestro modelo de estudio, la exposición subcrónica de *P. lima* (> 72 h hasta 336 h) en los TR1 y TR2 promovió la expresión de *hsp70*, indicando que bajo condiciones de exposición prolongada, se produce un estado de estrés que exige una respuesta de adaptación y/o compensación, con la que se restaurará la homeostasis celular y, por ende, la supervivencia celular. Sin embargo, lo anterior no se

observó bajo condiciones de concentración extrema tal como TR3 ( $30 \times 10^3$  cel  $\text{ml}^{-1}$ ). Con el análisis de estos resultados se confirmó que la *hsp70* es un elemento que participa activamente en respuesta al estrés, y que muestra ser inducible con respecto al tiempo de exposición y la dosis de *P. lima*, actuando como estresor.

La familia de las glutatión-S-transferasas (GST) juega un papel muy importante en el sistema de defensa celular y en los procesos de detoxificación de una amplia variedad de compuestos xenobióticos. Esta familia de isoenzimas cataliza la conjugación del glutatión con una variedad de compuestos electrofílicos carcinogénicos, metales citotóxicos y detoxificación de productos de reacciones de oxidación. Se ha documentado que GST participa activamente en la remoción de hidrocarburos y pesticidas en *C. gigas*, demostrando una fuerte expresión tejido-específica relacionada a su vez con el tiempo y el tratamiento (Boutet et al., 2004a). En este trabajo, los tratamientos TR1 y TR2 provocaron la represión del gen que la codifica, particularmente bajo exposición aguda y hasta las 72 h en la exposición subcrónica. Después de 168 h de exposición la expresión de *gst* en *C. gigas* no mostró diferencias significativas comparado con el control, pero estas diferencias fueron estadísticamente significativas en otros tiempos de muestreo (Figura 5). Este comportamiento puede interpretarse como una respuesta compensatoria a través de la expresión del gen *gst* debido a la exposición subcrónica de la condición de estrés generada por la dosis del dinoflagelado. Además, a las 336 h se determinó un alto nivel de expresión en ambos tratamientos (TR1 y TR2), confirmando que la condición de estrés sobre los organismos es inducido por las condiciones experimentales. Por otro lado, el tratamiento TR3 causó la represión del gen *gst* en ambas fases del bioensayo (agudo y subcrónico) (Figura 5). Considerando que el mecanismo de defensa de *C. gigas* depende de la presencia de proteínas funcionales en cantidades adecuadas, se deduce que la capacidad para responder a estresores ambientales después de un evento FANs puede estar sensiblemente disminuida. En este caso, la presencia o ausencia de transcritos del gen *gst* puede funcionar como un biomarcador de situación de estrés en *C. gigas*.

La glutamina sintetasa (GS) es una proteína de respuesta a estrés que ha sido estudiada en diversas especies de moluscos bivalvos, principalmente como gen monitor ante la presencia de pesticidas e hidrocarburos (Boutet et al., 2004a). En este trabajo, encontramos que en *C.*

*gigas*, *P. lima* no tiene un fuerte efecto sobre la transcripción de este gen, ya que su expresión no presentó variación significativa dosis-tiempo-dependiente a las 168 h de exposición. Sin embargo, a los 14 días (336h) de exposición al dinoflagelado se observó sobre-expresada tanto en TR1 como en TR2, lo que puede relacionarse con una respuesta adaptativa (Figura 5). Esto si consideramos que GS es un gen constitutivo, pero inducible bajo la presencia de un factor de estrés como podría ser el tiempo-dosis de *P. lima*.

La enzima GS participa en la fijación de amonio y en la biosíntesis de glutamina para la excreción de amonio, lo que concuerda con lo observado por García-Lagunas y Hernández-Saavedra (2013, sometido PlosOne) en un modelo experimental similar (con *Gymnodinium catenatum*, productor de toxina paralizante –PSP-). En este trabajo, se midió la excreción de amonio durante 24 h pero no se encontraron variaciones de pH o en la concentración de amonio en el agua. Por tanto, cuando los ostiones juveniles están en condiciones experimentales de estrés prolongado activan su metabolismo para la eliminación de amoníaco, que de otra forma podría generar citotoxicidad y pérdida de la homeostasis celular, con una amplia variedad de efectores moleculares como la compensación de la glutamina sintetasa, entre otros.

Superóxido dismutasa tipo Cu-Zn (SOD), en este estudio, se observó la represión de la expresión del gen que codifica *sod* en los ostiones expuestos a *P. lima*, sólo en el TR2 ( $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) (tiempo cero) se registró un aumento significativo en la expresión como una respuesta inmediata a la presencia de este agente estresante (Figura 5). Considerando que la SOD es una enzima con un papel clave en la cascada de protección contra especies reactivas de oxígeno (EROs), y a la luz de nuestros resultados *C. gigas* no tiene la protección contra el daño celular que las EROs pueden generar a sus macromoléculas; el resultado puede ser la vulnerabilidad (secundaria) a enfermedades infecciosas o cambios ambientales, que al igual que otros bivalvos carecen de respuesta inmune específica (Lacoste et al., 2002; Manduzio et al., 2005; Renault, 2008). Aunado a esto, la disminución de la expresión de SOD afecta la capacidad fagocítica, que se incrementa por el estrés y es el primer mecanismo de defensa mediante el cual los moluscos y otros invertebrados neutralizan la ingestión de patógenos (Coyne, 2011). En este trabajo, la expresión observada en los genes implicados en la síntesis de proteínas antioxidantes sugieren que *P.*

*lima* provoca un desequilibrio metabólico (o la pérdida de la homeostasis celular) tiempo-dosis-dependiente, lo que puede hacer a los ostiones vulnerables a la invasión por patógenos oportunistas presentes en el hábitat marino y/o para otros contaminantes subyacentes (pesticidas, policlorobifenilos, etc.).

En este trabajo se observó que el umbral de toxicidad de *P. lima* a *C. gigas* se da a los 14 días de exposición a una dosis diaria de  $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> (TR3) (Figura 2). En las condiciones anteriores se determinó en los ostiones un estado patológico dado por la represión de la expresión de los genes 28S, GS, HSP70, GST y SOD, lo que resultó en un daño a su integridad significativo e irreversible. Este hecho confirma las observaciones de Vasconcelos et al. (2010), quienes señalan que las toxinas producidas por dinoflagelados afectan a la integridad de los organismos acuáticos en las primeras fases de desarrollo, ya que los invertebrados marinos no tienen sistemas enzimáticos eficaces para la desintoxicación, haciéndolos más susceptibles debido a sus altas tasas metabólicas.

De los genes de respuesta a estrés analizados, en este estudio se encontró que sólo cuatro de ellos participaron en la respuesta inmediata de *C. gigas* cuando se expone a *P. lima* (identificado como tiempo cero, figura 2). Por otra parte, se observó que su expresión está regulada durante la adaptación del organismo a la condición experimental, que se indica a través de su tasa metabólica disminuida. A los 14 días (dependiendo de la dosis) se observó una inducción de la expresión, que puede ser interpretada como un mecanismo de compensación a la desestabilización metabólica expresada a través de los niveles de ARNm durante la exposición del ostión al dinoflagelado tóxico.

### *8.1.3 Análisis de la expresión diferencial génica de proteínas de regulación del ciclo celular mediante y respuesta inmune RT-PCR y qPCR*

En *C. gigas*, se ha reportado un grupo de genes cuya expresión se regula en respuesta a agentes químicos y a factores ambientales de estrés entre los que destacan p21, CAFp55, EF2 y LGBP (Hamdoun et al., 2003; Tanguy et al., 2003; Boutet et al., 2004; David, 2005; Tanguy et al., 2005; Farcy, 2008a). Se ha sugerido que las reacciones acopladas de fosforilación-desfosforilación son uno de los puntos centrales del mecanismo de control del ciclo celular, donde los reguladores clave de las transiciones del ciclo celular

son las ciclinas dependientes de quinasas (CDK) (Aguda, 1999). Actualmente, la vía de AO (ej. la inhibición de la proteína-fosfatasa) se reconoce como un proceso bioquímico general sobre la promoción de tumores a través de su acumulación en los órganos digestivos de los mariscos que se alimentan por filtración (Fujiki et al., 1997). En la mayoría de los organismos, la expresión de los genes p21, CAFp55 y EF2 se clasifican en las vías dependientes del ciclo celular (Arima et al., 2004).

El p21 es un gen supresor de tumores que controla la sucesión de la fase G1-S en el ciclo celular (Mirzayans et al., 2012); nuestros resultados mostraron que la desregulación en la expresión de p21 es tiempo-dosis dependiente. Su et al. (2004) encontraron que los niveles de p21 en las células están controlados por la proteína p53 (supresor de tumores). González-Romero et al. (2012) encontraron que la activación de la vía de señalización de p53 se debe a agentes que dañan el ADN, lo que resulta ya sea como una activación del punto de control del ciclo celular para promover la supervivencia celular o una muerte celular vía apoptosis. Las toxinas producidas por *P. lima*, que son responsables de la intoxicación por mariscos conocida como síndrome diarreico (DSP), están representadas principalmente por el AO (Pistocchi et al., 2012) que inhibe la serin/treonin-proteín fosfatasa tipos PP1 y PP2A (Bailoan y Takai, 1988), lo que resulta en la hiperfosforilación de la proteína p53 (Vale y Botana, 2008; Milczarek et al., 1999). Estas observaciones concuerdan con regulación del metabolismo y el ciclo celular, y la coordinación de la expresión génica observada con el TR2 a las 168 h y 336 h bajo esta condición experimental (Figura 3a y b). Los genes relacionados con la regulación del ciclo celular y la traducción proteica (p21, CAFp55 y EF2) presentaron una baja expresión (fue detectada por el método semi-cuantitativo, pero fue confirmada por qPCR) (Figura 3a, b y c). Se demostró que las células de *C. gigas* fueron afectadas en relación a la pérdida del control de la progresión en el ciclo celular (o la función apoptótica) por el efecto de las células tóxicas. Las consecuencias podrían ser una desregulación transcripcional o una replicación anormal por pérdida de la coordinación entre la replicación de ADN y la progresión del ciclo celular, en cualquier caso, la inestabilidad del genoma resulta como una característica de las células tumorales (Carvalho Pinto-Silva et al., 2005).



El factor de ensamblaje de la cromatina subunidad p55 (CAFp55) es una parte importante de la función de las histonas, están implicadas en el mantenimiento de la integridad y regulación transcripcional del genoma. Teniendo en cuenta que el AO es un potente promotor de tumores con efecto aneugénico y clastogénico del material hereditario, más notablemente por roturas en el ADN y alteraciones en los mecanismos de reparación del ADN (Valdiglesias et al., 2010). Recientemente, la presencia de variantes de histonas involucradas en la reparación de la cromatina y la especialización de ADN se ha puesto de manifiesto en los mejillones y las almejas con base en pruebas de genotoxicidad del AO en el medio marino (González-Romero et al., 2012). Es consistente con nuestros resultados sobre la posible participación de CAFp55 en el proceso de replicación del ADN, en particular con altos niveles de transcritos que muestran una división celular descontrolada, probablemente causado por el elevado número (y persistencia) de *P. lima* en la fase subcrónica (Figura 3b).

El factor de elongación 2 (EF2) está involucrado en el proceso de traducción en células eucariotas y es dependiente de GTP, por tanto, la fosforilación de este factor se asocia directamente con la tasa de estimulación para elongación de la cadena peptídica. La velocidad de traducción es controlada por la fosforilación en varios residuos de serina y treonina (Browne y Proud, 1989); por tanto, el EF2 en estado de fosforilación podría interferir con la capacidad de éste para interactuar de forma constructiva con el ribosoma. En nuestro escenario, inhibidores de la proteín-fosfatasa contenidos en el dinoflagelado provocan un incremento en la tasa de expresión del gen *ef2* o bien la hiperfosforilación induce una acumulación e indirectamente la inhibición de la síntesis de proteínas. Nuestros resultados están de acuerdo con las observaciones de Redpath y Proud (1989) quienes estudiaron el mismo fenómeno, pero en un modelo de lisados de reticulocitos de conejo y ácido okadaico (AO). Por tanto, nuestros resultados nos permiten suponer que el efecto primario del AO en la inhibición de la elongación en la síntesis de proteínas, aparentemente resulta de la mayor sensibilidad de desfosforilación de EF2. Sin embargo, este trabajo representa sólo una pequeña contribución a la comprensión de los mecanismos del efecto (más precisamente, los efectos) de *C. gigas* expuesto a *P. lima* tratando de emular en condiciones de laboratorio un evento natural de marea roja. La disminución de la expresión

tiempo-dosis-dependiente fue observada después de 168 h, lo que sugiere que hay una obstrucción obvia en la síntesis de proteínas del ostión (Figura 3c). Además, también mostraron bajos niveles de expresión después de 168 h de exposición las respuestas cuantificadas de p21 y CAFp55, por lo que es evidente una baja regulación de la progresión del ciclo celular. Con lo anterior, podemos suponer que la desregulación de los puntos de control del ciclo celular puede provocar una disfunción y la muerte celular o, al menos, una mayor susceptibilidad a las perturbaciones ambientales, tales como agentes que dañan el ADN (genotóxicos).

En los moluscos y otros invertebrados, los mecanismos de defensa del huésped y la homeostasis son componentes claves modulados por el sistema inmune innato (Mydlarz y Harvell, 2006). Los organismos distinguen entre lo propio y lo extraño a través de los receptores de reconocimiento, entre los que destacan proteínas de unión a lipopolisacárido- $\beta$ -1,3-glucano (LGBP). Estas moléculas pertenecen a diferentes familias de proteínas intra- y extra-celulares con funciones pleiotrópicas de reconocimiento de los patrones moleculares asociados de patógenos (Philipp et al., 2012; Guo et al., 2004; Kanneganti et al., 2007; Huan et al., 2010), que en la respuesta inmune de organismos adultos actúan como receptores de reconocimiento de unión a lipopolisacáridos.

Los niveles de expresión LGBP se muestran gráficamente en la Figura 3d, donde son evidentes las diferencias entre los tratamientos y el control, mientras que no hay diferencias entre tratamientos, lo que indica que *P. lima* estimula la transcripción de LGBP en *C. gigas* independientemente del número de células dinoflagelado. Posteriormente, se observó una subexpresión hasta 336 h en TR1 y TR3; como en todos los genes presentados previamente se observó sobreexpresión en TR2 a partir de la hora 6 y hasta las 168 h de exposición con una disminución final a las 336 h (etapa subcrónica), particularmente notable en TR2 (Figura 1d). Nuestros resultados son consistentes con las investigaciones de Philipp et al. (2012) y sus hallazgos en *Mytilus*, donde encontraron que su sistema inmune tiene un complejo repertorio de receptores de reconocimiento innatos. Nosotros asociamos la baja expresión de LGBP a las 336 h de exposición con una pérdida de la homeostasis celular en los ostiones, así como a una manifiesta inestabilidad metabólica irreversible. La observación de la expresión de LGBP tiempo-dependiente en *C. gigas* expuestos a

diferentes concentraciones de *P. lima* y la sub-expresión a partir de la exposición temprana, indican que LGBP no sólo se comporta como un gen constitutivo, sino que también es inducible de acuerdo a la temporalidad de la condición de exposición (aguda y subcrónica). Se confirma además la participación de LGBP, que juega un papel crítico en la interacción *C. gigas*-*P. lima*, además de lo comprobado como un importante receptor de reconocimiento de patrones para respuesta inmune sistémica.

La figura 2 muestra una caída consistente en el nivel de expresión de los genes analizados en todos los tratamientos a las 6 h de exposición; este comportamiento particular puede asociarse con dos fenómenos: el comportamiento de cierre temporal de valvas documentado en moluscos para evadir las condiciones ambientales desfavorables (tipo de alimento, depredadores, parámetros físico-químicos, etc.), y por la disminución en su tasa metabólica por una baja actividad de filtración. Tran et al. (2010) midieron y documentaron este comportamiento de *C. gigas* expuesto bajo condiciones experimentales a *Alexandrium minimun*, ellos encontraron que los moluscos reducen su metabolismo y que el principal factor para la reapertura de las valvas es la anoxia y la acumulación de metabolitos secundarios, por lo que el ostión demanda recuperar su capacidad de filtración y además necesita comer y respirar. Por esta razón, en nuestras condiciones experimentales hasta 3 h de exposición, el efecto de la presencia de dinoflagelado es apenas perceptible (*C. gigas* reconoce *P. lima* como alimento inapropiado, de hecho durante este período se neutraliza por la formación de pseudoheces). Sólo a partir de 12 h de exposición fue observado un claro efecto de *P. lima* en la expresión de los genes analizados.

Adicionalmente, en bioensayos de laboratorio, se encontró que *C. gigas* selecciona su alimento a partir de una mezcla de las microalgas *I. galbana*, *Gymnodinium catenatum* y *P. lima* (López-Cuevas, 2013), donde se encontró selectividad y preferencia por la ingestión de *G. catenatum* e *I. galbana*, siendo *P. lima* eficazmente filtrada después de 3 a 6 h de exposición; ambas observaciones explican en gran medida el comportamiento observado en la expresión de los genes estudiados en relación con el tiempo de exposición.

Por otra parte, y contrariamente a lo que esperábamos, no se observó un comportamiento proporcional en *C. gigas* en respuesta al efecto de la concentración de células de *P. lima*. Sin embargo, los resultados obtenidos se pueden explicar de la siguiente manera: *P. lima* a

una concentración de  $0.3 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$  (TR1) es imperceptible a simple vista en un cuerpo de agua y tiene un efecto moderado en los ostiones, lo que no compromete su supervivencia (ya que sólo se observa un aumento transitorio de la expresión -de 24 a 72 h-) y se comporta de manera similar al control. En el caso del TR2 ( $3 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$ ) que corresponde a una densidad celular que causa la discoloración visible de la masa de agua, el aumento sostenido en la expresión de los genes analizados después de 6 h de exposición indica que la presencia del dinoflagelado tiene un efecto perjudicial (Figura 2). Dicho efecto se compensa con el incremento en la tasa de transcripción de genes relacionados con el ciclo celular, a diferencia de los genes de respuesta al estrés que son expresados de forma inmediata (*gs*, *gst* y *hsp70*) como lo observado (Anexo II). A pesar de la lesión, el desequilibrio es irreversible, ya que al final del bioensayo (336 h) y hasta las 408 h post-bioensayo (17 días) la mayor parte de los organismos murieron ( $\approx 40\%$ ). En los organismos expuestos al TR3, el daño causado por *P. lima* (y en particular el efecto de la AO) es irreversible; la reducción en la expresión de los genes analizados puede interpretarse como el inicio de un proceso de muerte de los organismos. Sar et al. (2002) reportaron que de  $0,1$  y  $1 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$  de *Dinophysis* y/o *Prorocentrum* (productores DSP) causan manifestaciones de la presencia de toxinas en los moluscos bivalvos, y en TR3 *P. lima* está muy por encima de este rango de toxicidad. Con base en lo que se discutió anteriormente, básicamente a partir de mediciones de la expresión por la técnica semi-cuantitativa (RT-PCR), se realizaron determinaciones de expresión cuantitativa (qPCR) sobre los organismos sometidos al TR2 ( $3 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$ ) a las 72, 168, y 336 h de exposición, la figura 4 muestra los resultados que concuerdan con los obtenidos a partir de la técnica semi-cuantitativa (Figura 3).

#### 8.1.4 Validación de genes de referencia

La PCR en tiempo real es una herramienta precisa para la medición de la expresión génica. Este método requiere un control interno (o también conocido como gen de referencia), con el fin de normalizar la expresión génica y así eliminar el error debido a las variaciones experimentales como: variabilidad intrínseca de ARN, impurezas durante la extracción de ARN, diferencias en la transcripción reversa, error de pipeteo y eficiencias de

amplificación de la PCR (Bustin et al., 2005). La expresión de los genes de referencia (GRs) debe ser estable durante el experimento, por tanto, el estudio de la estabilidad de la expresión de estos genes se recomienda antes de la cuantificación de los genes de interés por PCR cuantitativa (Dheda et al., 2005; Bustin et al., 2010).

Los genes de referencia seleccionados están involucrados en el metabolismo ribosomal (28S), la estructura del citoesqueleto (ACT, TUB  $\beta$ ), el metabolismo de los carbohidratos (GAPDH) y el proceso de síntesis proteica (EF1- $\alpha$ ). Estos cinco genes de referencia utilizados en el presente estudio, han sido previamente seleccionados y analizados en diferentes estudios. El gen GAPDH se utiliza con frecuencia como un GR en humanos (Barber et al., 2005) o plantas (Barsalobres-Cavallari et al., 2009). La expresión de este gen fue inestable en nuestro experimento por lo que se demostró que es inadecuado utilizarlo en la normalización de los datos. GAPDH está implicado en la exportación nuclear de ARN, la replicación y reparación del ADN, fusión de membranas de exocitosis, la organización del citoesqueleto y la actividad fosfotransferasa (Bustin, 2002). Cho et al. (2008) demostraron que la expresión de 2 isoformas de GAPDH de *Oplegnathus fasciatus* fue inestable y modulada en respuesta a las infecciones bacterianas y virales.

EF1- $\alpha$  es un miembro de la familia de proteínas G, y una de las cuatro subunidades que componen el factor de elongación 1 en eucariotas (Browne y Proud, 2002; Ejiri 2002 que juega un papel clave en la traducción de proteínas. Araya et al. (2008) demostraron que este gen, fue un gen de referencia adecuado durante un reto *in vitro* de hemocitos de *Mya arenaria* con *Vibrio splendidus*. Morga et al. (2010), analizaron la expresión de genes de referencia en hemocitos sanos o infectados con el protozoario *Bonamia ostreae* de *Ostrea edulis*; ellos encontraron que GAPDH y EF1- $\alpha$  fueron los genes más estables utilizando el algoritmo de GeNorm y NormFinder. En peces como el salmón del Atlántico, el EF1- $\alpha$  fue identificado como el gen más estable en tejidos sanos o infectados con virus (Jorgensen et al., 2006). Este gen también se reportó como el más estable durante el desarrollo de las larvas de los peces planos *Solea senegalensis* (Infante et al., 2008) y durante el desarrollo larvario de la lubina europea *Dicentrarchus labrax* (Mitter, 2009). Estos estudios concuerdan con el presente trabajo donde encontramos al EF1- $\alpha$  como uno de los genes más estables.

El gen de la actina se utiliza comúnmente como gen de referencia en los ensayos de qPCR, el análisis de nuestros resultados lo muestran como el tercer gen más estable, que podría incluirse para normalizar los datos. Morga et al. (2010), sugieren que el parásito *B. ostreae* afecta a la expresión de  $\beta$ -actina que fue el gen menos estable; dicho gen está implicado en la estructura del citoesqueleto y desempeña un papel fundamental en la fagocitosis y la encapsulación.

Los genes ribosomales son conocidos porque tienen un alto nivel de conservación de nucleótidos a través de taxones. Xue et al. (2010), encontraron que el 28S fue el gen más estable. Sin embargo, en el presente estudio la expresión de 28S fue variable, por tanto, no cumple con el requisito para ser un buen gen de referencia. Du et al. (2013) demostraron que los genes ribosomales como la proteína ribosomal L7 (RL7) y el gen 18S ARNr (RS18) podrían ser utilizados como controles internos para el estudio de la expresión génica en las larvas de ostión del Pacífico con crecimiento normal e infectadas con el virus (OsHV-1).

Nuestros análisis GeNorm y NormFinder, mostraron al gen de  $\beta$ -tubulina (*tub*) como uno de los genes más estables. Las tubulina- $\alpha$  y  $\beta$  son proteínas estructurales que forman los microtúbulos del citoesqueleto, cuyas propiedades son diferentes en función de las modificaciones postraduccionales de las proteínas en el extremo C-terminal (Hammond et al., 2008; Kierszenbaum, 2002). En este trabajo, los tres diferentes enfoques analíticos utilizados (GeNorm, NormFinder y BeesKeeper) mostraron resultados concordantes, indicando que *tub* fue uno de los genes más estables (Figura 6 y 7). Sin embargo, sólo NormFinder y BeesKeeper concuerdan que el siguiente gen más estable es *gapdh*, a diferencia de GeNorm que mostró a *efl- $\alpha$*  como el más estable. No obstante, la mayoría de estudios recomiendan el algoritmo de GeNorm para seleccionar el gen adecuado para la normalización. El análisis GeNorm mostró que el número óptimo de genes de referencia para el presente estudio son tres, al igual que Vandesompele et al. (2002) sugieren que en la mayoría de los casos tres o menos genes de referencia es el número óptimo para una estrategia de normalización válida.

## 8.2 Bioensayo de *C. gigas* tejido-específico talla 40-60 mm: glándula digestiva

### 8.2.1 Eficiencia de amplificación de oligonucleótidos diseñados para RT-PCR: expresión tejido-específico.

Primeramente se realizó una selección semi-cuantitativa del nivel de expresión de cada gen, agrupado en procesos de señalización metabólica seleccionados (Tabla I), para inferir una respuesta fisiológica integrada. En los cinco tejidos seleccionados (hemocitos, gónada, músculo, branquia y glándula digestiva) se examinó la expresión de cada gen (Figura 8). Con lo anterior se determinó qué grupo de genes de señalización celular se analizarían en cada uno de esos tejidos (Figura 9), observándose que los más activos en relación a la selección anterior fueron branquia y glándula digestiva. Por tanto, la selección cuantitativa mediante q-PCR se realizó en dos procesos de respuesta celular importantes como son genes relacionados a citoesqueleto y genes involucrados en el ciclo celular.

### 8.2.2 Análisis de la expresión diferencial génica de proteínas del citoesqueleto, caspasa, proteínas de regulación del ciclo celular mediante qPCR.

El efecto de la exposición de *P. lima* por 10 días, específicamente sobre expresión diferencial de genes relacionados con citoesqueleto, apoptosis y control del ciclo celular fueron evaluados en glándula digestiva de organismos de *C. gigas* (talla 40-60 mm). Aunque muchos estudios han evaluado el efecto de las algas nocivas y sus toxinas sobre el sistema inmune de bivalvos (Franchini et al., 2010; Mello et al., 2012), sus respuestas fisiológicas y de comportamiento (Gainey y Shumway, 1988) las interacciones biológicas entre las algas tóxicas y los bivalvos todavía no son claramente entendidas, sobre todo a nivel molecular. En este estudio fue evaluada la respuesta molecular en las células de glándula digestiva de *C. gigas*, siendo el órgano blanco en la bioacumulación del dinoflagelado y la toxina polietérea, ácido okadaico (AO) producida por *P. lima*. En un estudio realizado por Bauder et al. (2001), encontraron que el AO y sus derivados fueron detectados en diversos tejidos de *Argopecten irradians*. Rossignoli y Blanco (2008) demostraron que esta toxina se absorbe preferencialmente en fase acuosa y es acumulada y transformada principalmente dentro de células de glándula digestiva en ciertos bivalvos. Tanto el AO como algunos de sus derivados actúan inhibiendo las protein-fosfatasa

serina/treonina, especialmente PP2A (Cohen, 1989; Fujiki y Saganama, 1993). Estas enzimas están implicadas en los procesos de desfosforilación de los residuos de la fosfoserina y fosfotreonina de los substratos proteicos y por tanto en la regulación del metabolismo celular, replicación del ADN, transcripción, progresión celular, diferenciación, desestabilización genómica e incluso oncogénesis (Ten-Hage et al., 2000; Vanden Heuvel, 2002). La hiperfosforilación causada por la inhibición de la actividad de las proteínas fosfatasa serina/treonina, afecta a la secreción de  $\text{Na}^+$  y a la permeabilidad de los fluidos de las células intestinales, de ahí el efecto diarreico de estas toxinas (Cohen et al., 1990). También se han determinado y estudiado significativamente los efectos crónicos que tras una exposición prolongada al grupo de toxinas polietéreas, les confiere carácter de promotores tumorales y carcinogénicos (Fujiki et al., 1988; Fujiki y Saganama, 1999; Ten-Hage et al., 2000). El impacto en humanos asociada a la toxicidad crónica de las toxinas DSP como promotores tumorales y componentes mutagénicos no ha sido adecuadamente estimado (Cordier et al., 2000). Cruz et al. (2013) dedujeron el posible mecanismo de absorción del AO en células de glándula digestiva, haciendo alusión a las características de hidrofobicidad que presenta la molécula y la formación de estructuras diméricas acopladas a ciertos iones, lo que facilita su difusión e incrementa la permeabilidad de la membrana en estas células. Lo anterior es importante y se correlaciona con la expresión diferencial detectada en nuestra investigación, ya que el tiempo de exposición a *P. lima* en fase subcrónica con dosis diaria, impacta en la desregulación de proteínas del citoesqueleto y factores transcripcionales relacionados con progresión del ciclo y reparación del daño celular (Figura 10 y 11).

Actina y tubulina son las principales proteínas globulares del citoesqueleto en células eucariotas, y ambas tienen una propiedad común que es formar estructuras reversibles en polímeros largos y flexibles, filamentos de actina y microtúbulos, respectivamente. Ambas proteínas juegan un papel importante en una variedad de funciones celulares (Eriksson et al., 1992). Por otro lado, se ha encontrado un número emergente de citotoxinas de origen marino para unirse ya sea a actina o tubulina, lo que resulta en la inhibición o mejora de la polimerización. El ácido okadaico se ha demostrado que estimula la motilidad celular, pérdida de estabilidad de adhesión y una consecuente pérdida de organización del



citoesqueleto (Vale y Botana, 2008), todo lo anterior atribuible a la bien documentada interacción de las toxinas DSP con las serin-treonin fosfatasas. Con nuestros resultados podemos inferir que bajo la condición experimental probada en el presente trabajo, el ácido okadaico no sólo se une a los filamentos de actina y microtúbulos, sino que también a nivel de expresión de los genes de *act* y *tub*; la presencia de *P. lima* provoca una desregulación en su concentración de transcritos conforme transcurre el tiempo de exposición, el punto máximo se observó a los 10 días (Figura 10a y b).

Nosotros corroboramos que la expresión de ACT es afectada por el tiempo de exposición y *C. gigas* responde de manera compensatoria a los 10 días, en la posible pérdida de la homeostasis, ya que los filamentos de actina participan en mantener el orden de localización y organización de orgánulos celulares (Vale y Botana, 2008). Además, se observa una sobre-expresión inducida por la sola presencia de *P. lima* (control positivo), el resultado soporta la idea de que la presencia de las toxinas DSP inducen dicho cambio en la expresión de genes relacionados con el citoesqueleto como consecuencia de su efecto sobre las fosfatasas (Figura 10a).

En el caso de  $\beta$ -tubulina mayormente asociada a la integración de los microtúbulos celulares necesarios en la dinámica del complejo de Golgi durante la mitosis y la función del citoesqueleto microtubular en su reordenación celular. Su regulación está dada por fosfatasas jugando un papel importante durante morfogénesis. Por tanto, en la figura 10b se observa un alto nivel de expresión del gen *tub*, a los primeros 3 días del bioensayo indicando un incremento significativo en el procesamiento y clasificación del tráfico proteico y lipídico en la células digestivas de *C. gigas* como respuesta al efecto de la presencia de la toxina DSP presente, ya que los microtúbulos del citoesqueleto están más asociados a la formación de sacos membranosos utilizados en la distribución de macromoléculas que realiza el complejo de Golgi previo a la mitosis. Sin embargo, ante la exposición subcrónica el nivel de expresión determinado sugiere un problema celular complejo más enfocado a muerte celular por daño y descamación del epitelio confirmado con observaciones histológicas reportadas en este mismo documento en la sección 7.4.5 y reportadas en estudios anteriores por De las Heras (2009). Lo anterior se considera una situación fisiológica crítica para *C. gigas* ya que afecta su crecimiento y supervivencia.

Por otro lado Kerr et al. (1972) observaron que la mayoría de los cambios morfológicos se debían a un grupo de cisteína proteasas que se activan en células apoptóticas en diversos tejidos y tipos celulares. Al grupo de proteasas se les denomina caspasas (cisteín-proteasas específicas de ácido aspártico). Las caspasas están altamente conservadas en la evolución de las especies (Budihardjo et al., 1999). Considerando que el sistema inmune de los moluscos consiste únicamente en inmunidad innata y es dependiente sobre componentes celulares (Kiss, 2010), en estudios realizados con células de humanos se determinó una respuesta inflamatoria innata mediada por la función de recepción y propagación de señales inflamatorias donde la IL-1 $\beta$  requiere ser activada por la acción de la proteasa caspasa 1, y se determinó que la expresión del ARNm de IL-1 $\beta$  aumenta rápidamente después de diferentes estímulos neurotóxicos (Cuenca-López et al., 2010). Por tanto la abundancia de transcrito determinada para el gen *cpl1* en el 3er. día de exposición y sostenida hasta el día 10 (Figura 10c), nos indica que *C. gigas* se encuentra en un proceso inflamatorio y probablemente en proceso de deterioro celular irreversible o muerte, por el involucramiento de estas enzimas en dichos procesos. Lo anterior como respuesta a la temporalidad y concentración celular de *P. lima* y al efecto genotóxico del ácido okadaico (AO). Varios estudios han demostrado que el AO causa disrupción en citoesqueleto y activación de apoptosis (Leira et al., 2003).

Se tiene un claro conocimiento del efecto genotóxico del AO como un potente promotor de tumores en dos etapas experimentales sobre carcinogénesis *in vivo* sobre piel de ratón (Fujiki et al., 1988) o mucosa de glándula estomacal de rata (Suganuma et al., 1988). Valdíglesias et al. (2011) determinó cómo el AO provocaba la interrupción del ciclo celular en ciertos tipos celulares de humanos. Por otra parte encontró que AO aumenta la fase G1 del ciclo celular, lo que conlleva a la apoptosis. Sin embargo la respuesta molecular por la presencia de dinoflagelados tóxicos a nivel de control de ciclo celular no está documentada. El control adecuado del ciclo celular se da mediante la acción coordinada de una familia de factores de transcripción los cuales resultan clave para la homeostasis celular. La desregulación a nivel epigenético de genes supresores de tumores como *p53*, cuya activación fue propuesta como punto de control del ciclo celular para promover la supervivencia o en la muerte celular apoptótica, diversos estudios realizados sobre líneas

celulares derivadas de tumores sólidos humanos, demuestran comportamientos dinámicos de *p53* y *p21* en la respuesta al daño del ADN y resultan clave en la progresión de fase G2. Por otro lado, modificaciones a histonas presentes en la cromatina por el factor proteico *p55*, entre otros, están asociados con procesos patológicos como el cáncer.

De los resultados obtenidos podemos inferir que el nivel de expresión de *p21* se incrementa significativamente al principio del tiempo de exposición al TR1, observándose el pico mayor a la 24 h. Y la segunda desregulación de *p21* se determinó en el día 3. El nivel subsecuentemente decae hasta el día 10 similar a la condición basal (control negativo) (Figura 11d). A nivel de regulación del ciclo celular se espera sincronía en los niveles de expresión de *p21* vs. *p53* (Bunz et al., 1998), la cual fue observada solamente en TR2 a las 24 h. Sin embargo *p53* tuvo una abundancia de expresión cuando *C. gigas* fue expuesto sólo con *P. lima* (control positivo) al día 3 (Figura 11c). Al actuar *p53* como centinela en la vigilancia del daño celular, lo anterior sugiere que la expresión *p53* bajo esta condición con sólo *P. lima*, podría estar hiperfosforilado el factor proteico *p53*, ya que su fosforilación es esencial para la acumulación nuclear de esta proteína y su activación en el proceso de reparación. Sin embargo la presencia de la toxina producida por *P. lima* y su efecto inhibitorio de fosfatasas pudiese estar provocando esta respuesta el día 3. En general se observó una desregulación en la concentración de transcritos de *p53* en el día 10 tanto con TR2 como en el control positivo respecto a su condición basal, lo que sugiere un posible punto de detección y reparación de daño celular (Figura 11c).

Por otro lado, el gen *cafp55* se suma al comportamiento de sobre-expresión en etapas tempranas del reto TR2 donde a los 3 días presenta diferencias estadísticamente significativas igual que en el control positivo, lo cual propone que efectivamente la respuesta celular de *C. gigas* en la reparación de daño se está presentando ya que en los siguientes tiempos de muestreo su expresión fue baja (Figura 11b). Considerando el papel tan importante que juega este factor 1 de *p55* en el sistema de marcaje para el ensamblaje de la cromatina, con base en nuestros resultados la sub-expresión de gen *cafp55* observada en los días 7 y 10 nos lleva a deducir que la estabilidad de la cromatina en su proceso de condensación para la realización de mitosis es inadecuado, se confirma lo dicho por

Ridgway y Almouzni, (2000) donde la integridad del genoma en el pase de replicación de ADN y reparación está regulado epigenéticamente.

Aunado a lo anterior el análisis de expresión del gen *ef2* un factor traduccional, estuvo reprimido en los días 7 y 10 indicando al igual que los otros factores transcripcionales medidos, un compromiso celular significativo en *C. gigas* bajo la condición experimental con TR2. Sin embargo, comparando con el control positivo la respuesta fue significativa en los primeros 3 días de exposición por tanto, coincide con los resultados de expresión de factores transcripcionales y este factor involucrado en la elongación de proteínas dependiente de GTP como un mecanismo de defensa ante estas condiciones experimentales (Figura 11a).

Nuestros resultados sugieren una respuesta temprana de las células de glándula digestiva de *C. gigas* expuesto a *P. lima*. La expresión relativa de los factores transcripcionales *p21*, *p53*, *cafp55* y traduccionales *ef2* indica una desregulación en los procesos de replicación y un proceso defectuoso en la reparación del daño celular, resultados que en lo general coinciden con los efectos identificados en la genotoxicidad del ácido okadaico especialmente en moluscos bivalvos (González-Romero et al., 2012). Cabe mencionar que la función de puntos de control en el ciclo celular es para asegurar o resguardar la integridad del genoma. Y cuando estos puntos regulatorios son desregulados como aquí se demuestra, por la presencia de dinoflagelado tóxico, pueden enviar señales de muerte celular, o bien se pierde la integridad del cromosoma, y por tanto la transmisión de información en el flujo genético se vuelve aberrante. Con lo anterior se incrementa la susceptibilidad a perturbaciones ambientales en el organismo modelo *C. gigas*.

### 8.2.3 Análisis de la tasa de aclaramiento

Es bien sabido que las toxinas DSP pueden acumularse en los tejidos de los moluscos bivalvos a través de los procesos de alimentación, por tanto, existen varios estudios que se han enfocado al estudio del efecto de la ingesta de dinoflagelados productores de dichas toxinas, abarcando desde comportamiento alimenticio (Shumway, 1991; Wilsh et al., 1998, Hegaret et al., 2007), la cinética de acumulación (Laabir et al., 2007) hasta los mecanismos de depuración y los daños citológicos (Shumway, 1991; Lassus et al., 2000). En este

estudio, *C. gigas* fue expuesto durante un periodo de 10 días a diferentes concentraciones de *P. lima*, tratando de emular (con sus obvias limitaciones) el escenario al que se enfrentan los organismos en el ambiente marino, durante su primer contacto en un evento FAN. En este trabajo, los resultados muestran que los ostiones prefieren filtrar *I. galbana* sobre *P. lima*, con una remoción de casi el 100 % de las células en un periodo de 24 h (Figura 12). Las observaciones realizadas durante las primeras 2 horas, indican que los ostiones expuestos al dinoflagelado filtraron una cantidad moderada del dinoflagelado tóxico, principalmente en la concentración celular más alta, mostrando un comportamiento de cierre parcial de valvas. Con las dietas mezcladas se observó una clara preferencia por la ingestión de *I. galbana*, sin embargo, aquí se demuestra que *C. gigas* es capaz de ingerir a *P. lima* cuando se encuentra sólo, removiendo el 80 % de las células. Por otro lado, con la dieta de  $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>, el ostión tiene la capacidad de remover el 50 % de las células durante las 24 h de exposición; bajo estas condiciones no se registraron muertes en ningún tratamiento, lo que indica que los ostiones de 40-60 mm pueden hacer frente a los efectos adversos del consumo de estas células tóxicas.

Como se ha mencionado antes, se observó la formación de pseudoheces en los tratamientos con *P. lima*, pero en mayor proporción en el TR3 ( $30 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>), dominando en la composición de las pseudoheces *P. lima* esto indica que los ostiones lo eliminaron selectivamente por encima de *I. galbana* (Figura 12). La producción de pseudoheces se ha documentado como un mecanismo fundamental de pre-ingestión, ya que no solo previene el exceso de la capacidad ingestiva de los animales, sino también facilita la selección de partículas nutritivas y el rechazo de las menos nutritivas (Shumway, 1991; Wilsh et al., 1998; Lassus et al., 2000; Laabir et al., 2007). Sin embargo, nuestro trabajo demostró que la adición de un dinoflagelado tóxico como *P. lima* en una dieta a base de la haptofita *I. galbana* altera significativamente la capacidad de filtrado de *C. gigas* y estimula la producción de pseudoheces. Un comportamiento similar fue observado en estudios anteriores (López-Cuevas, 2013).

#### 8.2.4 Análisis histológico de estómago y glándula digestiva (40-60 mm)

Las lesiones y los cambios estructurales del epitelio gastrointestinal son importantes indicadores de la salud de los bivalvos. Las alteraciones estructurales se presentan más comúnmente en la glándula digestiva y se componen de aplanamiento celular, inflamación, rotura, exfoliación y metaplasia. Algunos de estos cambios pueden ser reversibles, lo que indica cambios temporales en el medio ambiente, sin embargo, otras manifestaciones patológicas como la exfoliación del epitelio, cuando es grave, conlleva a una pérdida de células epiteliales, y tiene la apariencia de una severa y mórbida enfermedad terminal. Las alteraciones en el epitelio de los órganos digestivos se han observado tanto en las larvas, juveniles y adultos en diferentes condiciones de estrés (Elston, 1999). Se han reportado daños en moluscos bivalvos expuestos a toxinas marinas, algunos estudios describen respuestas inflamatorias, agregación/infiltración de hemocitos en órganos y/o hemocitos en diapédesis a través del epitelio, principalmente en el tracto digestivo, debido a que es sitio principal de acumulación de las toxinas (Hégaret et al., 2007, 2012; Galimany et al., 2008a). También en otros tejidos, como las branquias, se han registrados cambios como excesiva producción de mucus, fusión de filamentos branquiales y pérdida de cilios (Hégaret et al., 2007). En el ostión *C. gigas* expuesto a dinoflagelados tóxicos como *Alexandrium minimum*, se ha observado principalmente inflamación del tracto digestivo e infiltración de hemocitos hacia el lumen del estómago y glándula digestiva, además de un adelgazamiento del epitelio que rodea dicha glándula (Heberkorn et al., 2010).

Algunos estudios de daños histopatológicos a causa de dinoflagelados de especies de *Prorocentrum* realizados tanto en el laboratorio como en campo se mencionan a continuación: Wikfors y Smolowitz (1995), reportaron descamación del túbulo digestivo en vieiras alimentadas con *P. minimum*. Hégaret et al. (2005a, b) encontraron cambios en las concentraciones y proporciones de diferentes tipos de hemocitos y fagocitos en *C. virginica* y *Argopecten irradians* expuestos a *P. minimum*. Además, signos histopatológicos de adelgazamiento de los túbulos del tracto digestivo y descamación de las células intestinales en *C. gigas* expuesto a *P. rathymum* fueron observados por Pearce et al. (2005).

En el presente trabajo, se pudo observar que los organismos expuestos al dinoflagelado tóxico *P. lima*, modifican en primera instancia su comportamiento alimenticio, disminuyendo su tasa de aclaramiento y tasa de síntesis de pseudoheces y mucus. Los signos histológicos encontrados fueron: respuesta inflamatoria generalizada y daños principalmente en el estómago y glándula digestiva. En la glándula digestiva se observó principalmente adelgazamiento y, en algunos casos, rompimiento de los epitelios tubulares, así como pérdida de cilios y una severa infiltración de hemocitos hacia el lumen de la glándula digestiva (y el estómago), lo que corrobora lo observado por otros autores. Por tanto, estas observaciones nos permiten suponer que la exposición a microalgas tóxicas puede activar un mecanismo de defensa o reparación en respuesta a los daños de tejidos resultantes en bivalvos (Galimany et al., 2008a; Hegaret et al., 2007; Heberkorn et al., 2010).

## 9. CONCLUSIONES

- La presencia de *P. lima* productor de toxinas DSP si genera *C. gigas* un impacto significativo tiempo-dosis-dependiente.
- Se determinó el efecto de *P. lima* en dos fases: aguda con genes relacionados con respuesta temprana (adaptativa) y subcrónica con la expresión de genes involucrados en señalización de procesos compensatorios.
- El bajo nivel de expresión de *glutación-S-transferasa* tiempo-dependiente indica que el proceso de eliminación de *P. lima* no coincide con la ruta de eliminación de otros contaminantes.
- Se confirma que la primera línea de defensa de *C. gigas* como respuesta inmune innata, esta mediada por la expresión de genes de respuesta a estrés *glutamina sintetasa(gs)*, *glutación-S-transferasa(gst)*, *proteína de shock térmico 70(hsp70)* y *superóxido dismutasa Cu-Zn(sod Cu-Zn)* en etapa temprana ante la presencia de *P. lima*.
- Se identificó que *tub*, *ef1- $\alpha$*  y *act* como genes de referencia más estables para utilizarlos en estudios que implican una exposición a dinoflagelados tóxicos como *P. lima* en juveniles de *C. gigas*. Este estudio es el primero, que describe la evaluación de genes de referencia por PCR en tiempo real, bajo las condiciones mencionadas.
- La presencia de *P. lima* provoca una clara desregulación en la expresión relativa de los genes *p21*, *p53*, *cafp55*, *ef2* tanto en organismo completo como en células de glándula digestiva, lo que induce una pérdida del control del ciclo celular, afectando la homeostasis y supervivencia de *C. gigas*.
- La abundancia determinada de transcrito del gen *lgbp* indica que *P. lima* es reconocido como agente extraño por *C. gigas*.
- En glándula digestiva se observó un efecto crítico por la desregulación en la expresión de los genes *act* y *tub*. Su desregulación indica que la integridad celular estaba perdiéndose.



- El comportamiento determinado del gen *cp1* indica que se induce un proceso inflamatorio en glándula digestiva.
- El análisis histológico de estómago y glándula digestiva de *C. gigas* se observó el daño tisular provocado por presencia de *P. lima*. Presentando pérdida de cilios y estructura celular. Además de inflamación y presencia de hemocitos en tejido periférico y con infiltración en los órganos.
- Es necesario continuar con este tipo de experimentos para entender de manera integral la respuesta de *C. gigas* como mecanismo de defensa ante la presencia de dinoflagelados tóxicos.

## 10. LITERATURA CITADA

Aguda, B.D. 1999. Instabilities in phosphorylation-dephosphorylation cascades and cell cycle checkpoints. *Oncogene*, 18:2846-2851.

Ajuzie, C.C. 2007. Palatability and fatality of the dinoflagellate *Prorocentrum lima* to *Artemia salina*. *Journal of Applied Physiology* 19, 513–519.

Alvarez-Cárdenas, J. 2009. Efecto de la expresión de semillas de ostión japonés *Cassostrea gigas* a organismos productores de toxinas DSP, en genes relacionados con regulación proteica y el metabolismo energético celular. Memoria de Residencia Profesional. Instituto Tecnológico de La Paz, México. p87.

Andersen, C.L., J.L. Jensen, T.F. Orntoft. 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer research* 64:5245-5250.

Anderson, D. 2007. The Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms, Multidisciplinary Approaches to Research and Management by Donald M. Anderson. IOC Technical Series 74, UNESCO 2007. IOC/2007/TS/74, 38 p.

Anderson, D.R., K.P. Burnham, W.L. Thompson. 2000. Null hypothesis testing: problems, prevalence, and an alternative. *The journal of wildlife management*, 912-923.

Araya, M.T, A. Siah, D. Mateo, F. Markham, P. McKenna, G. Johnson. 2008. Selection and evaluation of housekeeping genes for hemocytes of soft-shell clams (*Mya arenaria*) challenged with *Vibrio splendidus*. *J Invertebr Pathol*, 99:326-31.

Arima, Y., T. Hirota, C. Bronner. 2004. Down-regulation of nuclear protein ICBP90 by p53/p21 Cip1/WAF1 -dependent DNA-damage checkpoint signals contributes to cell cycle arrest at G1/S transition. *Genes Cells*, 9:131–142.

Barber, R.D., D.W. Harmer, R.A. Coleman, B.J. Clark. 2005. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*, 21:389-95.

Bardouil, M., M. Bohec, M. Cormerais, S. Bougrier, P. Lassus. 1993. Experimental study of the effect of a toxic microalgal diet on feeding of the oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *J Shellfish Res*, 12:417-422.

Barsalobres-Cavallari, C.F., F.E. Severino, M.P. Maluf, I.G. Maia. 2009. Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. *BMC Mol Biol*, 10:17.

- Bauder, A.G., A.D. Cembella. 2000. Viability of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* following ingestion and gut passage in the bay scallop *Argopecten irradians*. *Journal of Shellfish Research* 19, 321-324.
- Bauder, A.G., A.D. M. Cembella, Bricelj, M. Quilliam. 2001. Uptake and fate of diarrhetic shellfish poisoning toxins from the dinoflagellate *Prorocentrum lima* in the bay scallop *Argopecten irradians*. *Marine Ecology Progress Series* 213, 39-52.
- Beninger, P.G., A. Veniot, Y. Poussart. 1999. Principles of pseudofeces rejection on the bivalve mantle: integration in particle processing. *Mar Ecol-Prog Ser*, 178:259-269.
- Bialojan, C., A. Takai. 1988. Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases Specificity and kinetics. *Biochem J*, 256:283-290.
- Bougrier, S., A. Hawkins, M. Héral. 1997. Preingestive selection of different microalgal mixtures in *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis*, analyzed by flow cytometry. *Aquaculture* 150, 123-134.
- Boutet, I., A. Tanguy, D. Moraga. 2004a. Characterization and expression of four mRNA sequences encoding glutathione S-transferases pi, mu, omega and sigma classes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to hydrocarbons and pesticides. *Marine Biology* 146, 53-64.
- Boutet, I., A. Tanguy, D. Moraga. 2004b. Molecular identification and expression of two non-P450 enzymes, monoamine oxidase A and flavin-containing monooxygenase 2, involved in phase I of xenobiotic biotransformation in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1679, 29-36.
- Boutet, I., A. Tanguy, D. Moraga. 2004. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *GENE* 329, 147-157.
- Browne, J., C.G. Proud. 2002. Regulation of peptide-chain elongation in mammalian cells. *Eur J Biochem*, 269:5360-5368.
- Budihardjo, I., H. Oliver, M. Lutter, X. Luo, X. Wang. 1999. Biochemical pathway of caspase activation during apoptosis. *Annual review of cell and developmental biology*, 15(1), 269-290.
- Bunz, F., A. Dutriaux, C. Lengauer, T. Waldman, S. Zhou, J.P. Brown, B. Vogelstein. 1998. Requirement for p53 and p21 sustain G2 arrest after DNA damage. *Science*, 282(5393), 1497-1501.
- Bustin, S.A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR) trends and problems. *J Mol Endocrinol*, 29:23-39.

- Bustin, S.A., V. Benes, T. Nolan, M.W. Pfaffl. 2005. Quantitative real-time RT-PCR a perspective. *J Mol Endocrinol*, 34:597-601.
- Bustin, S.A. 2010. Why the need for qPCR publication guidelines? -The case for MIQE. *Method*, 50:217-26.
- Bustin, S.A., T. Nolan, , 2004a. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Journal of Biomolecular Techniques*, 15, 155–166.
- Buttermer, W.A., D. Abele, D. Costantini. 2010. The ecology of antioxidants & oxidative stress in animals from bivalves to birds: oxidative stress and longevity. *Functional Ecology*, 24, 971-983.
- Campa-Córdova, A., E. Núñez-Vázquez, A. Luna-González, M.J. Romero-Geraldo, F. Ascencio. 2009. Superoxide dismutase activity in juvenile *Litopenaeus vannamei* and *Nodipecten subnodosus* exposed to the toxin dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 149, 317-322.
- Carvalho Pinto-Silva, C.R., E.E. Creppy, W.G. Matias. 2005. Micronucleus test in mussels *Perna perna* fed with the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Archives of Toxicology*, 79, 422-426.
- Cho, Y.S., S.Y. Lee, K.H. Kim, Y.K. Nam. 2008. Differential modulations of two glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase mRNAs in response to bacterial and viral challenges in a marine teleost *Oplegnathus fasciatus* (Perciformes). *Fish Shellfish Immunol*, 25:472-476.
- Chomczynski, P., N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*, 162 (1), 156-159.
- Chrousos, G., P. Gold. 1992. The concepts of stress and stress system disorders. *Journal of the American Medical Association* 267,1244-1252.
- Cognie, B., L. Barillé, Y. Rincé. 2001. Selective feeding of the oyster *Crassostrea gigas* fed on a natural microphytobenthos assemblage. *Estuar. Coast*, 24(1): 126–131.
- Cohen, P. 1989. The structure and regulation of protein phosphatases. *Annual Review of Biochemistry*, 58, 453-508.
- Cohen, P., C.F. Holmes, Y. Tsukitani. 1990. Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends in Biochemical Sciences*, 15: 98-102.
- Cohen-Fernandez, E.J., F.F. Pedroche, M. Rodríguez-Palacios, S. Álvarez-Hernández, E. Meave del Castillo. 2010. Molecular phylogeny of *Prorocentrum* (Dinoflagellata) from the

- Pacific Coast of Mexico based on the parsimony analysis of fragments of LSUrDNA and SSUrDNA. *Int. J. Plant Physiol. Biochem*, 2:29-37.
- Cordier, S., C. Monfort, L. Miossec, S. Richardson, C. Belin. 2000. Ecological analysis of digestive cancer mortality related to contamination by diarrhetic shellfish poisoning toxins along the coasts of France. *Environmental Research Section A*, 84:145-150.
- Coughlan, J. 1969. The estimation of filtering rate from the clearance of suspensions. *Marine Biology*, 2: 356-358.
- Coyne, V.E. 2011. The importance of ATP in the immune system of molluscs. *Invertebrate Survival Journal*, 8, 48-55.
- Cruz, P.G., M. Norte, A.H. Creus, J.J. Fernández, A.H. Daranas. 2013. Self-Association of Okadaic Acid: Structural and Pharmacological Significance. *Marine Drugs*, 11(6), 1866-1877.
- Cuenca-López, M.D., D. Brea, T. Segura, M.F. Galindo, D. Antón-Martínez, J. Agulla, J. Jordán. 2010. La inflamación como agente terapéutico en en el infarto cerebral: respuesta inflamatoria celular y mediadores inflamatorios. *Revista de Neurología*, 50(6), 349-359.
- Dahlhoff, E.P. 2004. Biochemical indicators of stress and metabolism: applications for marine ecological studies. *Ann. Rev. Physiol*, 66: 183–207.
- David, E., A. Tanguy, K. Pichavant, D. Moraga. 2005. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. *The FEBS Journal*, 272, 5635-5652.
- De las Heras, S. 2009. Efecto de dinoflagelados tóxicos del genero *Prorocentrum* (Dinophyceae) en el ostión japonés *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). Tesis de licenciatura. *Universidad Autónoma de Baja California Sur*. México. p85.
- Dheda, K., J.F. Huggett, J.S. Chang, L.U. Kim, S.A. Bustin, M.A. Johnson. 2005. The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. *Anal Biochem*, 344:141-143.
- Doucet, E., N.N. Ross, M.A. Quilliam. 2007. Enzymatic hydrolysis of esterified diarrhetic shellfish poisoning toxins and pectenotoxins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389,335-342.
- Du, Y., L. Shang, F. Xu, B. Huang, G. Zhang, L. Li. 2013. Validation of housekeeping genes as internal controls for studying gene expression during Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) development by quantitative real time PCR. *Fish & shellfish immunology* 34:939-945.

- Ejiri, S. 2002. Moonlighting functions of polypeptide elongation factor 1: from actin bundling to zinc finger protein R1-associated nuclear localization. *Biosci Biotechnol Biochem*, 66:1-21.
- Elston, R.A. 1999. Health Management, Development and Histology of Seed Oysters. *World aquaculture society*. Baton Rouge, Louisiana, USA. 110 pp.
- Eriksson, J.E., D.L. Brautigan, R. Vallee, J. Olmsted, H. Fujiki, R.D. Goldman. 1992. Cytoskeletal integrity in interphase cells requires protein phosphatase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(22): 11093-11097.
- Farcy, E, C. Fleury, C. Lelong, M.P. Dubos, C. Voiseux, B. Fievet, J.M. Lebel. 2008b. Molecular cloning of a new member of the p53 family from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and seasonal pattern of its transcriptional expression level. *Mar Environ Res*, 66: 300–308.
- Farcy, E., C. Voiseux, J.M. Lebel, B. Fiévet. 2008a. Transcriptional expression level of cell stress marker genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to acute thermal stress. *Cell Stress and Chaperones* 14:371-380. DOI 10.1007/s12192-008-0091-8.
- Franchini, A., D. Malagoli, E. Ottaviani. 2010. Targets and Effects of Yessotoxins, Okadaic Acid and Palytoxin: A Differential Review. *Marine Drugs*, 8, 658-677; doi:10.3390/md8030658.
- Fujiki, H., E. Sueoka, A. Komori, M. Suganuma. 1997. Tumor promotion and TNF- $\alpha$  gene expression by the okadaic acid class tumor promoters. *J Environ Sci Heal C*, 15:1-40.
- Fujiki, H., M. Suganuma. 1999a. Unique features of the okadaic acid activity class of tumor promoters. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 125:150-155.
- Fujiki, H., M. Suganuma, S. Yoshizawa, S. Nishiwaki, B. Winyar, T. Sugimura. 1999b. Mechanisms of action of okadaic acid class tumor promoters on mouse skin. *Environmental Health Perspectives*, 93:211–214.
- Fujiki, H., M. Suganuma. 1993. Tumor promotion by inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A: the okadaic acid class of compounds. *Adv Can Res* 61:143-194.
- Fujiki, H., M. Suganuma, H. Suguri, S. Yoshizawa, K. Takagi, N. Uda, K. Wakamatsu, K. Yamanda, M. Murata, T. Yasumoto, T. Sugimura. 1988. Diarrhetic shellfish toxins, dinophysistoxin -1 is a potent tumor promoter on mouse skin. *Japanese Journal Cancer Research*. 79:1089-1093.
- Gainey, L.F., S.E. Shumway. 1988. A compendium of the responses of bivalve molluscs to toxic dinoflagellates. *J. Shellfish Res*. 7(4):623–628.

- Galimany, E., I. Sunila, H. Hegaret, G. Wikfors, M. Ramón. 2008. Pathology and immune response of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.) after an exposure to the harmful dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Harmful Algae*. 7:630-638.
- Galimany, E., I. Sunila, H. Hegaret, M. Ramon, G.H. Wikfors. 2008a. Experimental exposure of the blue mussel (*Mytilus edulis*, L.) to the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense*: histopathology, immune responses, and recovery. *Harmful Algae*.7:702–711.
- Galindo, F., A. Flores. 2006. De la energética a la neurotransmisión de adenosin trifosfato y sus receptores. *Rev. Neurol.* 43:667–677.
- Gallo, M.C., S.D. Godínez, G.K. Rivera. 2001. Estudio preliminar sobre crecimiento y sobrevivencia del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg 1873) en Barra de Navidad, Jalisco, México. Universidad Autónoma de Guadalajara. Universidad y Ciencia, 17(34):83-91.
- Gerdes, D. 1983. The Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Part I. Feeding behavior of larvae and adults. *Aquaculture*. 31:195-219.
- Gifford, D.J., D.A. Caron. 2000. Sampling, preservation, enumeration and biomass of marine protozooplankton. In. *ICES Zooplankton Methodology Manual*. Harris RP, Wiebe P, Lenz J, Skjoldal HR, Huntley M: Eds.193–221. Academic Press, London.
- González-Rivera, L. 2009. Estudio de la capacidad hepatocarcinogénica del extracto de toxinas diarreas (DSP) del dinoflagelado *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge, en el modelo del hepatocito resistente en la rata Fischer 344. Tesis de licenciatura. *Universidad Autónoma de Baja California Sur*. México.49 pp.
- González-Romero, R., C. Rivera-Casas, J. Fernández-Tajes, J. Ausió, J. Méndez, J.M. Eirín-López. 2012. Chromatin specialization in bivalve molluscs: A leap forward for the evaluation of okadaic acid genotoxicity in the marine environment. *Comp Biochem Phys C*. 155:175–181.
- Guéguen, M., M. Bardouil, R. Baron, P. Lassus, P. Truquet, J. Massardier, Z. Amzil. 2008. Detoxification of Pacific oyster *Crassostrea gigas* fed on diets of *skeletonema costatum* with and without silt, following PSP contamination by *Alexandrium minutum*. *Aquat Living Resour.* 2:13-20.
- Guillard, R.L.L., R.H. Ryther. 1975. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. In Smith, W.L. and M.M., Chalg, (Eds) *Culture of Marine Invertebrate Animals*, Plenum Press. New York. 29-60 pp.
- Guo, J., H. Chen, Z. Sun, Y. Lin. 2004. A novel method for protein secondary structure prediction using dual-layer SVM and profiles. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*. 54:738–743.

- Gutiérrez-Kinejara, L. 2010. Efecto de la expresión de semillas de ostión japonés *Cassostrea gigas* a organismos productores de toxinas PSP, en genes relacionados con proteínas de estrés, cadena respiratoria y regulación de ácidos nucleicos. Memoria de residencia profesional. Instituto Tecnológico de La Paz, México. p
- Haberkorn, H., C. Lambert, N. Le Goïca, M. Guéguen, J. Moal, E. Palacios. 2010. Effects of *Alexandrium minutum* exposure on physiological and hematological variables of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*. *Aquat Toxicol.* 97:96–108.
- Hallegraeff, G.M. 1995 Harmful algal blooms: a global overview, In: *Manual on Harmful Marine Microalgae* (ed. by G.M. Hallegraeff, D.M. Anderson & A.D. Cembella), pp. 1-22. IOC Manuals and Guides, UNESCO. 33.
- Hamdoun, A., D.P. Cheney, G.N. Cherr. 2003. Phenotypic plasticity of HSP70 and HSP70 gene expression in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): implications for thermal limits and induction of thermal tolerance. *Biol Bull.* 205:160–169.
- Hammond, J.W., D. Cai, K.J. Verhey. 2008. Tubulin modifications and their celular functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20:71–76.
- Hégaret, H., G. Wikfors. 2005a. Time-dependent changes in hemocytes of eastern oysters, *Crassostrea virginica*, and northern bay scallops, *Argopecten irradians*, exposed to a cultured strain of *Prorocentrum minimum*. *Harmful Algae.* 4:187-199.
- Hégaret, H., G. Wikfors. 2005b. Effects of natural and field-simulate blooms of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* upon hemocytes of eastern oysters, *Crassostrea virginica*, from two different populations. *Harmful Algae.* 4: 201-209.
- Hégaret, H., P. da Silva, I. Sunila, S. Shumway, M. Dixon, J. Alix, G. Wikfors, P. Soudant. 2009a. Perkinsosis in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* affects responses to the harmful-alga, *Prorocentrum minimum*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.* 371:112-120.
- Hégaret, H., R. Smolowitz, I. Sunila, S. Shumway, J. Alix, M.S. Dixon. 2010. Combined effects of a parasite, QPX , and the harmful-alga , *Prorocentrum minimum* on northern quahogs, *Mercenaria mercenaria*. *Marine Environmental Research.* 69:337-344.
- Hégaret, H., G. Wikfors, S. Shumway. 2007. Diverse feeding responses of five species of bivalve mollusk when exposed to three species of harmful algae. *Journal of Shellfish Research.* 26:549-559.
- Hégaret, H., G. Wikfors, S. Shumway. 2009b. Biotxin contamination and shellfish safety, In: *Shellfish Quality and Safety* (ed. by Shumway, S.E. & G.E. Rodrick), 43-80 pp. Woodhead Publishing, Cambridge. 591.



- Hégaret, H., G. Wikfors, P. Soudant, C.E.S. Lambert, J. B. Bérard, 2007. Minimal apparent effect on oyster hemocytes, *Aquat. Living Resour.* 152:441-447.
- Heredia-Tapia, A., B. Arredondo-Vega, E. Núñez-Vázquez, T. Yasumoto, M. Yasuda, J.L. Ochoa. 2002. Isolation of *Prorocentrum lima* (Syn. *Exuviaellalima*) and diarrhetic shellfish poisoning (DSP) risk assessment in the Gulf of California, México. *Toxicon.* 40:1121-1127.
- Hernández-Sánchez, A. G. 2009. Efecto de la expresión de semillas de ostión japonés *Cassostrea gigas* a organismos productores de toxinas DSP, en genes relacionados con proteínas de estrés, cadena respiratoria y regulación de ácidos nucleicos. Memoria de residencia profesional. Instituto Tecnológico de La Paz, México. p
- Howard, D. W., C.S. Smith. 1983. Histological techniques for marine bivalve mollusks. *National Oceanic and Atmospheric Administration*. Technical Memorandum NMFS-F/NEC-25. U.S. Department of Commerce. 95 pp.
- Hrapchak, B.B., D.C. Sheehan. 1973. Theory and practice of histotechnology.
- Huan, P., X. Zhang, F. Li, Y. Zhang, C. Zhao, J. Xiang. 2010. Chromosomal localization and molecular marker development of the lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan binding protein gene in the Zhikong scallop *Chlamys farreri* (Jones et Preston) (Pectinoidea, Pectinidae). *Genet Mol Biol.* 33:36-43.
- Huggett, J., K. Dheda, S.A. Bustin, A. Zumla. 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity.* 6:279-284.
- Humason, L. G. 1979. Animal Tissue Techniques. San Francisco: W.H. Freeman and Company (ed.). Cuarta edición. 661 pp.
- Infante, C., M.P. Matsuoka, E. Asensio, J.P. Cañavate, M. Reith, M. Manchado. 2008. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in larvae from flatfish using real-time PCR. *BMC Mol Biol.* 9:28.
- Jorgensen, S.M., E.J. Kleveland, U. Grimholt, T. Gjoen. 2006. Validation of reference genes for real-time polymerase chain reaction studies in Atlantic salmon. *Mar Biotechnol.* 8:398-408.
- Kanneganti, T.D., Y. Fujimoto, K.J.H. Park, Y.G. Kim, M. Shaw, F.N. Inohara, G. Núñez G. 2007. Immune responses in mesothelial cells chemokine and antimicrobial innate Nod1/RICK and TLR signaling regulate. *J Immunol.* 179:514-521.
- Keppler, C.J., J. Hoguet, K. Smith, A.H. Ringwood, A.J. Lewitus. 2005. Sublethal effects of the toxic alga *Heterosigma akashiwo* on the southeastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Harmful Algae.* 4:275-285.

- Kerr, J., A. H. Wyllie, A.R. Currie. 1972. Apoptosis: basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*. 26:239-257.
- Kierszenbaum, A.L. 2002. Intramanchette transport (IMT): managing the making of the spermatid head, centrosome, and tail. *Mol Reprod Dev*. 63:1-4.
- Kiss, T. 2010. Apoptosis and its functional significance in molluscs. *Apoptosis* 15(3), 313-321.
- Laabir, M., Z. Amzil, P. Lassus, E. Masseret, Y. Tapilatu, R. De Vargas, D. Grzebyk. 2007. Viability, growth and toxicity of *Alexandrium catenella* and *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) following ingestion and gut passage in the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquat Living Resour* 20:51-57.
- Lacoste, A., S.K. Malham, F. Gelebart, A. Cueff, S.A. Poulet. 2002. Stress-induced immune changes in the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol*. 26:1-9.
- Lassus, P., M. Bardouil, P. Masselin, M. Naviner, P. Truquet. 2000. Comparative efficiencies of different non-toxic microalgal diets in detoxification of PSP-contaminated oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg). *J. Nat. Toxins*. 9(1):1-12.
- Leira, F., C. Álvarez, A.G. Cabado, J.M. Vieites, M.R. Vieytes, L.M. Botana. 2003. Development of an F-actin-based live-cell fluorimetric microplate assay for diarrhetic shellfish toxins. *Anal Biochem*. 317(2):129-135.
- Lindhal, O. 1998. Occurrence and monitoring of harmful algae in the marine environment, 409-423. En: Miraglia M., H. Van Egmond, C. Brera & J. Gilberts (Eds.). *Micotoxins and phycotoxins developments in chemistry, toxicology and food safety*. Proceedings of the IX International IUPAC *Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins*, pp. 409-423.
- Lindquist, S. 1986. The Heat-Shock Response. *Annual Review of Biochemistry* 55:1151-1191.
- López Cuevas, A. 2013. Efecto de la exposición de juveniles del ostión japonés *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) a dinoflagelados tóxicos productores de toxinas DSP y PSP. Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. México. p121.
- Manduzio, H., B. Rocher, F. Durand, C. Galap, F. Leboulenger. 2005. The point about oxidative stress in mollusks. *Review* 2:91-104.
- Mathews V.H. 2003. *Bioquímica*. Editorial Addison Wesley. 593-595pp.

- Matsuyama, Y., S. Shumway. 2009. Impacts of harmful algal blooms on shellfisheries aquaculture. In: *New technologies in aquaculture: Improving production efficiency, quality and environmental management* (ed. by G. Allan & G. Burnell) p.p 580-609. Woodhead Publishing, Cambridge 1232.
- Mello, D.F., E.S. Oliveira, R.C. Vieira, E. Simoes, R. Trevisan, A.L. Dafre, M.A. Barracco. 2012. Cellular and transcriptional responses of *Crassostrea gigas* hemocytes exposed *in Vitro* to brevetoxin (PbTx-2). *Mar Drugs*. 10:583-597.
- Mello, D.F., L.A.O. Proença, M.A. Barracco. 2010. Comparative study of various immune parameters in three bivalve species during a natural bloom of *Dinophysis acuminata* in Santa Catarina Island, Brazil. *Toxins*. 2:1166–1178.
- Milczarek, G.J., W. Chen, A. Gupta, J.D. Martinez, G.T. Bowden. 1999 Okadaic acid mediates p53 hyperphosphorylation and growth arrest in cells with wild-type p53 but increases aberrant mitoses in cells with non-functional p53. *Carcinogenesis*. 20:1043-1048.
- Mirzayans, R., B. Andrais, A. Scott, D. Murray. 2012. New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: Implications for cancer therapy. *J Biomed Biotechnol*. 16:ID170325.
- Mitter, K., G. Kotoulas, A. Magoulas, V. Mulero, P. Sepulcre, A. Figueras, B. Novoa, E. Sarropoulou. 2009. Evaluation of candidate reference genes for QPCR during ontogenesis and of immune-relevant tissues of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 4:340-7.
- Moore, S.K., V.L. Trainer, N.J. Mantua, M.S. Parker, E.A. Laws, L.C. Backer, L.E. Fleming. 2008. Impacts of climate variability and future climate change on harmful algal blooms and human health. *Environ Health*. 7:S2-S4.
- Morga, B., I. Arzul, N. Faury, T. Renault. 2010. Identification of genes from flat oyster *Ostrea edulis* as suitable housekeeping genes for quantitative real time PCR. *Fish & Shellfish Immunology*. 937-945.
- Mydlarz, L.D., L.E. Jones, C.D. Harvell. 2006. Innate immunity, environmental drivers, and disease ecology of marine and freshwater invertebrates. *Annu Rev Ecol Evol Syst*. 37:251–88.
- Núñez-Vazquez, E., A. Heredia-Tapia, J. Pérez-Urbiola, R. Alonso-Rodríguez, J. Arellano-Blanco, A. Cordero-Tapia, J. Pérez-Linares, J.L. Ochoa. 2003. Evaluation of dinoflagellate toxicity implicated in recent HAB events in the Gulf of California, México. In: *Proceedings from HABTech. Workshop, APEC. Nelson, New Zealand. November 2003*. (ed. by Holland, P., Rhodes, L. & Brown, L.), 64 pp. Cawthron Report No. 906.

- Ochoa, J.L., A. Sánchez-Paz, A. Cruz-Villacorta, E. Nuñez-Vázquez, A. Sierra-Beltrán. 1997. Toxic events in the northwest Pacific coastline of México during 1992-1995: origin and impact. *Hidrobiología*. 352:195–200.
- Paul, V., K. Arthur, R. Ritson-Williams, C. Ross, K. Sharp. 2007. Chemical Defenses: From Compounds to Communities. *Biological Bulletin*. 213:226-251.
- Pearce, I., J.H. Handlinger, G. Hallegraeff. 2005. Histopathology in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat caused by the dinoflagellate *Prorocentrum rhathymum*. *Harmful Algae*. 4:61-74.
- Pfaffl, M.W., A. Tichopad, C. Prgomet, T.P. Neuvians. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology letters* 26:509-515.
- Philipp, E.E.R., L. Kraemer, F. Melzner, A.J. Poustka, S. Thieme. 2012. Massively parallel RNA sequencing identifies a complex immune gene repertoire in the Iophotrochozoan *Mytilus edulis*. *PLoS ONE* 7.
- Pipe, R.K., J.A. Coles. 1995. Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. *Fish & Shellfish Immun.* 5:581–595.
- Pistocchi, R., F. Guerrini, L. Pezzolesi, M. Riccardi, S. Vanucci, P.C. Ciminiello, D. Aversano, M. Forino, E. Fattorusso, L. Tartaglione, A. Milandri, M. Pompei, M. Cangini, S. Pigozzi, E. Riccardi. 2012. Toxin levels and profiles in microalgae from the North-Western Adriatic sea-15 years of studies on cultured species. *Mar Drugs*. 10:140-162.
- Quilliam, M., J. Wright. 1995. Methods for diarrhetic shellfish poisons. In: *Manual on Harmful Marine Microalgae* (ed. by Hallegraeff G.M., Anderson D.M. & Cembella A.D.), pp 95-111. UNESCO.
- Redpath, N.T., C.G. Proud. 1989. The tumour promoter okadaic acid inhibits reticulocyte-lysate protein synthesis by increasing the net phosphorylation of elongation factor 2. *Biochem J*. 262:69-75.
- Renault, T.C. 2008. Genomics and mollusk pathogens: trends and perspective. *Journal of Veterinary Clinical Sciences*. 1 36-46.
- Ridgway, P., G. Almouzni. 2000. CAF-1 and the inheritance of chromatin states: at the crossroads of DNA replication and repair. *Journal of Cell Science*. 11(15):2647-2658.
- Romero Geraldo, R.J. 2012. Respuesta del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) a la exposición aguda y subcrónica a *Prorocentrum lima* (Ehrenberg, 1860) Stein 1975, productor de toxinas diarreas, mediante el seguimiento de la expresión de genes específicos. p. 61-89. En: Biodiversidad y vulnerabilidad de ecosistemas costeros

en BCS. Mónica Pérez-Ramírez y Salvador E. Lluch-Cota (Editores). ISBN 978-607-7634-07-2.

Romero-Geraldo, R.J., N.Y. Hernández-Saavedra. 2012. Stress gene expression in *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) in response to experimental exposure to the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge, 1975. *Aquac Res.* 1–11.

Rossignoli, A.E., J. Blanco. 2010. Subcellular distribution of okadaic acid in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*: First evidences of lipoprotein binding to okadaic acid. *Toxicon.* 55:221-226.

Rossignoli, A.E., J. Blanco. 2008. Cellular distribution of okadaic acid in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). *Toxicon.* 52:957-959.

Saavedra, C., E. Bachére. 2006. Bivalve genomics. *Aquaculture.* 256:1–14.

Sar, A., M. Ferrairo, B. Reguera. 2002. Floraciones algales nocivas en el Cono Sur Americano. *Instituto Español de Oceanografía.* 311.

Shumway, S., T. Cucci. 1987. The effect of the toxic dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis* on the feeding and behaviour of bivalve molluscs. *Aquatic Toxicology.* 10:9-27.

Shumway, S.E. 1990. A review of the effects of algal blooms on Shellfish and aquaculture. *J. World Aquaculture Society.* 21:65-104.

Shumway, S.E. 1991. Scallops: biology, ecology and aquaculture. *Elsevier Science Publishers B.V.* New York, USA. 1095 pp.

Sierra-Beltrán, A.P., M.L. Morquecho-Escamilla, C.H. Lechuga-Devezé, J.L. Ochoa. 1996. PSP monitoring program at Baja California Sur, México. Pp 105-108. En: Harmful and toxic algal blooms. Yasumoto, T., Oshima, Y. & Fukuyo, Y. (Eds). Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. Pp 586.

Sierra-Beltrán, A.P., A. Cruz-Villacorta, E. Núñez-Vázquez, L.M. Del Villar, J. Cerecero, J.L. Ochoa. 1998. An overview of the marine food poisoning in México. *Toxicon.* 35:447-453.

Sierra-Beltrán, A.P., D.B. Lluch-Cota, S.E. Lluch Cota, R. Cortés-Altamirano, M.C. Cortés-Lara, M. Castillo-Chávez, L. Carrillo, L. Pacas, R. Viquez, I. García-Hansen. 2004. Dinámica espacio-temporal de organismos precursores de marea roja en la costa pacífica de América del Norte y Centroamérica. *Rev Biol Trop,* 52:99-108.

Smayda, T.J. 2002. Adaptive ecology, growth strategies and the global bloom expansion of dinoflagellates. *J. Oceanogry,* 58:281–294.

- Stoecker, D., J. Adolf, A. Place, P. Glibert, D. Meritt. 2008. Effects of the dinoflagellates *Karlodinium veneficum* and *Prorocentrum minimum* on early life history stages of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Marine Biology*. 154:81–90.
- Su, J.J., K.C. Ban, Y. Li, L.L. Qin, H.Y. Wang, C. Yang, C. Ou, X.X. Duan, Y.L. Lee, R.Q. Yang. 2004. Alteration of p53 and p21 during hepatocarcinogenesis in tree shrews. *World J Gastroentero*. 10(Suppl 24):3559-3563.
- Suganuma, M., H. Fujiki, H. Suguri, S. Yoshizawa, M. Hirota, M. Nakayasu, M. Ojika, K. Wakamatsu, K. Yamada, T. Sugimura. 1988. Okadaic acid: an additional non-phorbol-12-tetradecanoate-13-acetate-type tumor promoter. *Proc Natl Acad Sci*. 85:1768–1771.
- Tanguy, A., I. Boutet, J. Laroche, D. Moraga. 2005. Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to pesticide exposure. *The FEBS Journal*. 272:390-403.
- Tanguy, A., I. Boutet, R. Riso, P. Boudry, M. Auffret, D. Moraga. 2003. Metallothionein genes in the European flat oyster *Ostrea edulis*: a potential ecological tool for environmental monitoring. *Marine Ecology Progress Series*. 257:87-97.
- Ten-Hage, L., N. Delaunay, V. Pichon, A. Coute, S. Puiseux-Dao, J. Turquet. 2000. Okadaic acid production from the marine benthic dinoflagellate *Prorocentrum arenarium* (Dinophyceae) isolated from Europa island coral reef ecosystem (SW Indian Ocean). *Toxicon*. 38: 1043-1054.
- Tiscar, P.G., F. Mosca. 2004. Defense mechanisms in farmed marine molluscs. *Vet.Res. Commun*. 28:57–62.
- Tran, D., H. Haberkorn, P. Soudant, P. Ciret, J. Massabuau. 2010. Behavioral responses of *Crassostrea gigas* exposed to the harmful algae *Alexandrium minutum*. *Aquaculture*. 298(3-4):338-345.
- Valdiglesias, V., J. Mendez, E. Pasaro, E. Cemeli, D. Anderson, B. Laffon. 2010. Assessment of okadaic acid effects on cytotoxicity, DNA damage and DNA repair in human cells. *Mutat Res*. 689:74–79.
- Valdiglesias, V., B. Laffon, E. Pasaro, D. Anderson, J. Méndez. 2011. Induction of oxidative DNA damage by the marine toxin okadaic acid depends on human cell type. *Toxicon*. 57(6):882-888.
- Vale, C., L. Botana. 2008. Marine toxins and the cytoskeleton: okadaic acid and dinophysistoxins. *FEBS Journal*. 275:6060-6066.
- Van Dolah, F.M. 2000. Marine algal toxins: Origins, health effects, and their increased occurrence. *Environ Health Persp*. 108:133-141.

- Vanden Heuvel, J.P. 2002. Xenobiotic receptor systems. Introduction and overview. En: Vanden Heuvel, J.P., Perdew, G.H., Mattes, W.B., Greenlee, W.F. (Eds.), *Comprehensive toxicology*, vol. XIV. Elsevier Science BV, Amsterdam, pp. 646.
- Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, F. Speleman. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*. 3(7):1-34.
- Vasconcelos, V., J. Azevedo, M. Silva, V. Ramos. 2010. Effects of marine toxins on the reproduction and early stages development of aquatic organisms. *Marine Drugs*. 8:59-79.
- Wikfors, G.H. 2005. A review and new analysis of trophic interactions between *Prorocentrum minimum* and clams, scallops and oysters. *Harmful Algae*. 4:585-592.
- Wikfors, G.H., R.M. Smolowitz. 1995. Experimental and histological studies of four life-history stages of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, exposed to a cultured strain of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Biol Bull*. 188:313–328.
- Wildish, D., P. Lassus, J. Martin, A. Saulnier, M. Bardouil. 1998. Effect of the PSP causing dinoflagellate, *Alexandrium* spp. on the initial feeding response of *Crassostrea gigas*. *Aquat. Living Resourc.* 11:35-43.
- Windust, A.J., J.L.C. Wright, J.L. McLachlan. 1996. The effects of the diarrhetic shellfish poisoning toxins, okadaic acid and dinophysistoxin-1, on the growth of microalgae. *Mar Biol*. 126:19-25.
- Xue, J.L., T.Z. Salem, C.M. Turney, X.W. Cheng. 2010. Strategy of the use of 28S rRNA as a housekeeping gene in real-time quantitative PCR analysis of gene transcription in insect cells infected by viruses. *J. Gen. Virol.* 163:210–215.
- Yasumoto, T., M. Murata, Y. Oshima, G.K. Matsumoto, J. Clardy. 1984. Diarrhetic shellfish poisoning. In: *American Chemical Society*, Ragelis EP, Ed.; Washington, USA, 207–214.
- Yasumoto, T., Y. Oshima, M. Murata, M. Sano, G.K. Matsumoto, J. Clardy. 1985. Diarrhetic shellfish toxins. *Toxicon*. 29:21-29.
- Yatsunami, J., A. Komori, T. Ohta, M. Suganuma, H. Fujiki. 1993. Hyperphosphorylation of Retinoblastoma Protein and p53 by Okadaic Acid, a Tumor Promoter. *Cancer Research*. 53:239-245.
- Zingone, A., H.O. Enevoldsen. 2000. The diversity of harmful algal blooms: a challenge for science and management. *Ocean Coastal Management*. 43:725–48.