



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

ACUMULACIÓN DE ÁCIDO ARAQUIDÓNICO EN
FOSFOLÍPIDOS Y TRIGLICÉRIDOS Y PRODUCCIÓN DE
PROSTAGLANDINAS CON RELACIÓN A ESTRÉS TÉRMICO
EN SEMILLA DE OSTIÓN *Crassostrea gigas*.

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales

(Orientación en Acuicultura)

P r e s e n t a

Yazmin Duran Encinas

La Paz, Baja California Sur marzo de 2020.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 9:00 a.m. horas del día 03 del Mes de marzo del 2020, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Acumulación de ácido araquidónico en fosfolípidos y triglicéridos y producción de prostaglandinas con relación a estrés térmico en semilla de ostión *Crassostrea gigas* "

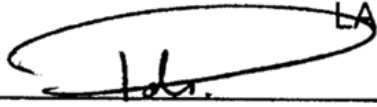
Presentada por el alumno:

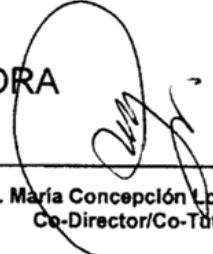
Yazmin Duran Encinas

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

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

LA COMISIÓN REVISORA


Dra. Elena Palacios Mechetnov
Director /Co-Director de Tesis


Dra. María Concepción Lora Vilchis
Co-Director/Co-Tutor


Dr. Edouard Kraffe
Co-Tutor


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

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dra. Elena Palacios Mechetnov
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Director de Tesis

Dra. María Concepción Lora Vilchis
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Tutora

Dr. Edouard Kraffe
Université de Bretagne Occidentale
Co-Tutor

Comité Revisor de Tesis

Dra. Elena Palacios Mechetnov
Dra. María Concepción Lora Vilchis
Dr. Edouard Kraffe

Jurado de Examen

Dra. Elena Palacios Mechetnov
Dra. María Concepción Lora Vilchis
Dr. Edouard Kraffe

Suplente

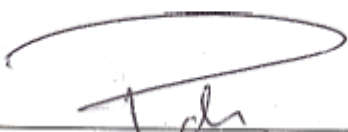
Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega

Resumen

Crassostrea gigas es un invertebrado marino que habita en la zona intermareal y, por lo tanto, está expuesto comúnmente a múltiples estresores ambientales, entre ellos la temperatura. En años recientes, se han reportado en México eventos de mortalidad masiva en *C. gigas* ligadas con el incremento en la temperatura durante el verano. En organismo sometidos a estrés térmico hay un incremento en la producción prostaglandinas (PG) por vía de la enzima ciclooxigenasa (COX) a partir del ácido araquidónico (ARA) presente en los fosfolípidos (FL) de la membrana celular, pero también de forma no enzimática por el incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS) al incrementar el metabolismo. Se ha observado que algunos organismos sometidos a estrés acumulan más ARA en los triglicéridos (TG) y se ha propuesto que esto pudiera ser un mecanismo para evitar la producción no regulada de PG. El objetivo del presente estudio es evaluar si el ARA de la dieta se acumula en TG o FL y si un estrés térmico promueve la transferencia de ARA de TG a FL para producir PG usando isótopos estables en ostión *C. gigas*. Para probar nuestra hipótesis, semillas de ostión *C. gigas* fueron aclimatadas a 20°C y alimentadas con microalga *Chaetoceros calcitrans* marcada con ¹³C. Las semillas de ostión fueron sometidas a un estrés térmico cíclico con un incremento de temperatura de 15°C diarios (de 20 a 35°C) y luego una disminución, por un periodo de 4 días. Un grupo de semillas de ostión se mantuvo a 20°C como control. Al final del experimento se tomaron muestras para análisis de ácidos grasos, isótopos estables, PG, expresión de HSP70, enzimas antioxidantes (SOD, GST, COI y GS) e histología. Las semillas sometidas a estrés térmico presentaron una disminución de la altura del epitelio de los túbulos digestivos y mayor número de hemocitos en el tejido conectivo, mayor concentración de PGEM y niveles de expresión significativamente más alto en todos los genes evaluados en este trabajo. El ARA en TG disminuyó su concentración en comparación con el control, mientras que en los FL no hubo diferencias significativas en la concentración. Se observó un

incremento, aunque no llego a ser significativo, de la proporción de ARA en los organismos estresados. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos con relación al marcaje isotópico entre tratamientos, pero sí la comparar fracciones lipídicas, encontrando que el ARA presentó una mayor diferencia entre fracciones, con un mayor porcentaje de enriquecimiento en los TG. En conclusión, se registró una disminución en la concentración de ARA en el grupo de ostiones sometidos a estrés térmico, este efecto concuerda con una estrategia ante el estrés térmico a través de la producción de PG, y aunque no se observó diferencia entre tratamientos en el marcaje isotópico del ARA, la diferencia entre fracciones lipídicas fue mayor para el ARA en comparación con el resto de los ácidos grasos lo cual indica diferencias en la regulación de este ácido graso.

Palabras clave: ácido araquidónico, estrés, fosfolípido, isótopo, molusco, temperatura, triglicérido, prostaglandina.



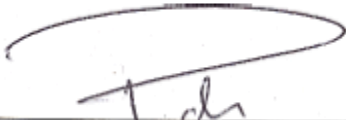
Vo.Bo. Dra. Elena Palacios Mechetnov
Directora de Tesis

Summary

Crassostrea gigas is a marine invertebrate that inhabits the intertidal zone and therefore, is commonly exposed to multiple environmental stressors, including temperature. In recent years mass mortality events have been reported in Mexico in *C. gigas* associated with the increase in temperature during the summer. Organisms under thermal stress present an increase in prostaglandins (PG) production by cyclooxygenases (COX), an enzymatic route using arachidonic acid (ARA) present in the phospholipids (FL) of the cell membrane as substrate, but PG can also increase non-enzymatically by reactive oxygen species (ROS) that are produced during increased metabolism. It has been reported that some organisms exposed to stress accumulate a higher concentration of ARA in triglycerides (TG) and concluded that this could be a mechanism to avoid the unregulated production of PG. The aim of the present study is to evaluate if ARA from diet accumulates in TG or FL and if a thermal stress promotes the transfer of ARA from TG to FL to increase PG production in oyster *C. gigas*. To demonstrate our hypothesis, oyster seeds *C. gigas* were acclimated at 20°C and fed with *Chaetoceros calcitrans* microalgae labeled with ¹³C. Oyster seeds were subjected to cyclic thermal stress with a temperature increase of 15°C daily (from 20 to 35°C) and subsequently a gradual decrease to 20°C, for 4 days. Oyster seed kept at 20°C was used as control. At the end of the experiment, samples were taken for analysis of fatty acids, stable isotopes, PG, gene expression (heat shock proteins (HSP70), antioxidant enzymes (SOD and GST) and stress proteins (IOC and GS), and histology. The oyster seeds exposed to thermal stress showed a decrease in the height of the epithelium of the digestive tubules, as well as a greater hemocyte count in the connective tissue using histology, higher levels of PGEM and an increase in expression levels in all the different genes evaluated in this work. ARA concentration in TG decreased compared to the control group, while in FL there were no significant differences. A non-significant increase in ARA proportion in stressed organisms with respect to the control group was observed. No significant differences were found between treatments in relation to

isotopic labeling, but the comparison of lipid fractions showed a greater variation of ARA with a higher enrichment in TG. In conclusion, there was a decrease in the concentration of ARA in the group of oysters subjected to thermal stress, this effect is consistent with a strategy for thermal stress through the production of PG. Although there were no differences between treatments in the isotopic labeling of ARA, the difference between lipid fractions was greater for the ARA compared to the rest of the fatty acids which indicates differences in the regulation of this fatty acid.

Key words: Arachidonic acid, stress, phospholipid, isotope, mollusk, temperature, triglyceride, prostaglandin.



Vo.Bo. Dra. Elena Palacios Mechetnov
Directora de Tesis

Dedicatoria

A mi familia:

A mi compañero de vida; Bryan

A mis padres Roberto y Elvira

A mis hermanos Rosita, Isaac e Israel

Agradecimientos

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) por ser la institución receptora de mis estudios de posgrado y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de manutención otorgada durante mis estudios de maestría (No. de Becario 633650).

Al personal de posgrado del CIBNOR dirigido por la Dra. Gracia Gómez por todo el apoyo brindado a lo largo de estos 2.5 años.

Al proyecto “Relación entre apoptosis y prostaglandinas inducidas por cambios de ácidos grasos en fosfolípidos en relación a incrementos de temperaturas en moluscos” a cargo de la Dra. Elena Palacios Mechetnov, por proveer el recurso económico que hizo posible la realización de este trabajo.

A los miembros de mi comité tutorial: Dra. Elena Palacios Mechetnov, Dra. Concepción Lora Vilchis y Dr. Edouard Kraffe por cada uno de sus comentarios, sugerencias y correcciones que han sido de gran ayuda para mí.

Agradezco de forma particular a la Dra. Elena, por guiarme en el mundo de la investigación científica por ser un gran ejemplo para mí, agradezco sus enseñanzas.

A la Université de Bretagne Occidentale (UBO) por aceptarme como institución receptora en la realización de una estancia de investigación y a la beca MIC-ERASMUS+ por la beca de movilidad otorgada. Al Dr. Rudolph Corvaisier (Pole Spectrométrie Océan, LEMAR) por el apoyo en el análisis de isótopos estables y al Dr. Edouard Kraffe (Lipidocean, LEMAR) por toda su ayuda y facilidades brindadas a lo largo de mi estancia en Brest.

Al grupo de trabajo metabolismo de lípidos, especialmente a la M. en C. Olivia Arjona López por el apoyo brindado durante el análisis de ácidos grasos y lípidos

totales y por su amistad, a la M. en C. Celene Lizeth Navarro Hurtado por el apoyo durante el análisis de prostaglandinas y a la M. en C. Paulina Ortega Flores por el apoyo durante el experimento y muestreo.

Al grupo de trabajo del laboratorio de genética acuícola del CIBNOR a cargo de la Dra. Ana María Ibarra Humphries, al técnico M. en C. José Luis Ramírez Arce y Gustavo, por proveer las semillas de ostión que se usaron durante el experimento.

Al grupo de trabajo del laboratorio de ecofisiología de organismos acuáticos del CIBNOR dirigido por la Dra. Teresa Sicard Gonzáles y a los técnicos Ing. Gilberto Gonzales Soriano y a la M. en C. Rosa Isela Vázquez Sánchez por el apoyo y las facilidades brindadas durante la realización del experimento.

Al grupo de trabajo del laboratorio de histología e histoquímica del CIBNOR dirigido por la Dra. María del Carmen Rodríguez Jaramillo y Eulalia Meza Chávez por el apoyo en el análisis histológico.

Al grupo de trabajo del laboratorio de genética molecular del CIBNOR, a la Dra. Crisalejandra Rivera Pérez y al técnico M. en C. Delia Rojas Posadas por el apoyo brindado durante el análisis de muestras de expresión de genes.

Al Dr. Réjean Tremblay y Dr. Bertrand Genard de la Université du Québec à Rimouski (UQAR) por proveer la microalga marcada isotópicamente usada durante el experimento.

A la Biol. Sandra de la Paz del laboratorio de nutrición acuícola del CIBNOR por facilitarme material usado durante el experimento y permitirme el uso de las instalaciones para la realización de un ensayo preliminar.

A mis compañeros de laboratorio metabolismo de lípidos (Oly, Celene, Paulina, Erica, Julio, Libertad, Itzi, Yahn y Clarita) por hacer mis días en el laboratorio muy agradables.

A todos mis compañeros de maestría por brindarme su amistad y compañerismo, especialmente a Susej López Marcos y Paola Anaya López por ser mis dos grandes compañeras de viaje con las cuales compartí momentos increíbles, sin ustedes no hubiera sido igual.

Contenido

Resumen	i
Summary	iii
Dedicatoria.....	v
Agradecimientos	vi
Contenido	ix
Lista de figuras.....	xi
Lista de tablas	xiii
Nomenclatura	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Generalidades del ostión japonés <i>Crassostrea gigas</i>	2
2.1.1 Hábitat.....	3
2.1.2 Alimentación.....	4
2.1.3 Reproducción y crecimiento	4
2.2 Cultivo de <i>Crassostrea gigas</i>	5
2.3 Estrés térmico	14
2.4 <i>Prostaglandinas (PG)</i>	18
2.5 Lípidos neutros y lípidos polares.....	21
2.6 Isótopos Estables.....	24
2.7 Pregunta de investigación.....	26
3. JUSTIFICACIÓN	27
4. HIPÓTESIS	28
5. OBJETIVOS	29
5.1 Objetivo general	29
5.2 Objetivos particulares.....	29
6. MATERIALES Y MÉTODOS	30
6.1 Experimento.....	30
6.1.1 Sistema experimental.....	30
6.1.2 Diseño experimental	31
6.1.3 Condiciones de cultivo	32
6.1.4 Producción de microalga marcada.....	33
6.1.5 Evaluación del consumo de microalga durante el experimento	33
6.1.6 Muestreo	34
6.2 Extracción de lípidos	34
6.2.1 Separación de lípidos neutros y polares	35
6.2.2 Análisis de ácidos grasos metil-esterificados (FAME).....	35
6.3 Determinación de peso seco de <i>Chaetoceros muelleri</i>	35
6.4 Lípidos Totales por Método gravimétrico	36
6.5 Análisis de Isótopos Estables.....	37

6.6 Análisis de PGEM	37
6.6.1 Preparación de la muestra y purificación (Precipitación con acetona)	38
6.6.2 Derivatización.....	38
6.6.3 Acidificación y extracción con acetato de etilo	39
6.6.4 Preparación de los reactivos específicos para el ensayo.....	39
6.6.5 Realización de ensayo	40
6.7 Análisis histológicos	40
6.7.1 Fijación en Davidson para histología cuantitativa	41
6.8 Análisis de expresión de genes.....	41
6.8.1 Extracción de ácido ribonucleico (ARN).....	41
6.8.2 Cuantificación y análisis de integridad del ARN	42
6.8.3 Diseño de oligonucleótidos	43
6.8.4 Síntesis de ADN de doble cadena complementario (ADNc)	45
6.8.5 Amplificación de genes mediante PCR	45
6.8.6 Análisis de la expresión de los genes de respuesta.....	46
6.8.7 Normalización $-2 \Delta\Delta CT$	46
6.9 Análisis estadístico.....	47
7.RESULTADOS	48
7.1 Experimento: Microalga marcada con ^{13}C	48
7.1.1 Supervivencia y consumo de microalga <i>C. muelleri</i>	48
7.1.2 Composición de microalga	50
7.1.3 Análisis histológico.....	52
7.1.4 Expresión de Genes.....	54
7.1.5 Lípidos.....	57
7.1.6 Isótopos estables	62
7.1.7 Análisis del metabolito de prostaglandina E (PGEM)	64
7.2 ARA marcado con ^{13}C	65
7.2.1 Isótopos estables	65
8. DISCUSIÓN	67
8.1 Isótopos estables	70
8.2 PGEM	73
8.3 Expresión de genes en <i>C. gigas</i> por efecto de estrés térmico.778.3.1 Expresión de HSP	77
8.3.2 Expresión de genes asociados al estrés oxidativo (SOD y GST).....	79
8.3.3 Expresión de ATP sintetasa	80
8.3.4 Expresión de Glutamina sintetasa (GS)	81
8.3.5 Expresión del gen citocromo c oxidasa subunidad I (COI).....	82
9.CONCLUSIONES	85
10. LITERATURA CITADA	86

Lista de figuras

Figura 1. Morfología de la concha del ostión japonés <i>Crassostrea gigas</i> . Valva interior mostrando la cicatriz del musculo abductor (izquierda) y valva exterior (derecha).....	3
Figura 2. Producción acuícola mundial del año 2015, considerando los organismos de ambientes marinos y costeros (FAO, 2016).	5
Figura 3. Producción mundial de moluscos y principales grupos cultivados (2015) (FAO, 2018).	6
Figura 4. Producción mundial por acuicultura de <i>C. gigas</i> en los últimos años (Estadísticas de pesca y acuicultura, 2010, 2015 y 2016).	6
Figura 5. Producción de ostión por acuicultura en México en los últimos años (SAGARPA, Anuario estadístico de acuicultura y pesca, 2003-2014).	8
Figura 6. Ilustración de los principales sistemas de cultivo de <i>C. gigas</i> en México. (A), sartas para engorda, (B) estantes para engorda, (C) módulos de cultivo de cultivo con cajas ostrícolas también llamadas canastas Nestier, (D) sacos de cultivo sobre camas. Tomado de Chávez-Villalba (2014).	9
Figura 7. Costales (bolsa de malla vexar) suspendidos sobre camas en el estero “El Cardón, San Ignacio. B.C.S. Fuente: Sol Azul Oysters.	10
Figura 8. Esquema que muestra la síntesis de prostaglandinas (PG) a partir del ácido araquidónico (ARA) por medio de la ciclooxigenasa (COX).	20
Figura 9. Formación de Isoprostanos (IsoPs) a consecuencia del ataque de las especies reactivas de oxígeno (ROS) sobre los fosfolípidos de membrana.	21
Figura 10. Sistema experimental, Laboratorio de Fisiología de Organismos Acuáticos.	30
Figura 11. Rampa de temperatura con un aumento de 3°C/hora, de 20°C a 35°C diseñada para las tinas sometidas a un estrés térmico. CIBNOR SC, LEOA, realizó: MC GGS, MC RIVS.....	31
Figura 12. Semilla de ostión <i>Crassostrea gigas</i> utilizadas en el experimento.	32
Figura 13. Consumo total de microalga <i>Chaetoceros muelleri</i> por las semillas de ostión <i>C. gigas</i> a temperatura control y sometidas a un estrés térmico.	48
Figura 14. Consumo de la microalga <i>C. muelleri</i> por 100 semillas de ostión para el día 1(A), 2(B), 3(C) y 4(D) a temperatura control y sometidas a un estrés térmico.	49
Figura 15. Porcentaje de lípidos neutros y polares (%) en relación al peso total de <i>C. muelleri</i> determinado por método gravimétrico.....	50
Figura 16. Imágenes digitalizadas de una sección transversal del epitelio de los túbulos de la glándula digestiva en semilla de ostión <i>C. gigas</i> a temperatura control (A) y sometidas a estrés térmico (B) (40x, Image Pro).	52
Figura 17. Altura del epitelio de los túbulos de la glándula digestiva de semilla de ostión <i>C. gigas</i> a temperatura control y sometidas a estrés térmico.	53
Figura 18. Número de hemocitos/mm ² en semilla de ostión <i>C. gigas</i> a temperatura control y sometidas a estrés térmico. *Indica diferencias significativas	53

Figura 19. Número de copias de la enzima proteína de choque térmico 70 (HSP70) mRNA por 10,000 copias de 28S mRNA. Las barras representan la media \pm E.E. de tres réplicas independientes.....	54
Figura 20. Número de copias de la enzima glutatión S-transferasa (GST) mRNA por 10,000 copias de 28S mRNA.....	55
Figura 21. Número de copias de la enzima glutamina sintetasa (GS) mRNA por 10,000 copias de 28S mRNA.....	55
Figura 22. Número de copias de la enzima superóxido dismutasa (SOD) mRNA por 10,000 copias de 28S mRNA.....	56
Figura 23. Número de copias de la enzima citocromo oxidasa I (COI) mRNA por 10,000 copias de 28S mRNA.....	56
Figura 24. Número de copias de la enzima ATP sintetasa mRNA/10,000 copias de 28S mRNA.....	57
Figura 25. Porcentaje de lípidos neutros en relación al peso seco total del organismo en semillas de ostión a temperatura control y sometidas a estrés térmico determinados por el método gravimétrico.....	58
Figura 26. Porcentaje de lípidos polares en relación al peso seco total del organismo en semillas de ostión a temperatura control y sometidas a estrés térmico determinados por el método gravimétrico.....	58
Figura 27. Concentración (mg 100 g ⁻¹) de ARA (20:4n-6) en LN de semillas de ostión a temperatura ambiente y sometidas a estrés térmico	61
Figura 28. Concentración (mg 100 g ⁻¹) de ARA (20:4n-6) en LP de semillas de ostión a temperatura ambiente y sometidas a estrés térmico.....	62
Figura 29. Concentración del metabolito de prostaglandina E (pg g ⁻¹) en tejidos de semillas de ostión <i>C. gigas</i> a temperatura control y sometidas a estrés térmico determinado por kit comercial EIA.	64
Figura 30. Porcentaje de átomos de ¹³ C en LN en semillas de ostión <i>C. gigas</i> a temperatura control y sometidas a estrés térmico.....	65
Figura 31. Porcentaje de átomos de ¹³ C en LP en semillas de ostión <i>C. gigas</i> a temperatura control y sometidas a estrés térmico.....	66

Lista de tablas

Tabla I. Especies de ostión de importancia comercial en México.....	7
Tabla II. Resumen de reportes de mortalidad de verano alrededor del mundo. ...	11
Tabla III. Principales estudios realizados sobre el ostión japonés <i>Crassostrea gigas</i> en México a partir de su introducción en 1972.....	13
Tabla IV. Determinación de peso seco de la microalga <i>Chaetoceros muelleri</i>	36
Tabla V. Oligonucleótidos diseñados a partir de secuencias homólogas reportadas en GenBank (NCBI).	44
Tabla VI. Proporción (% relativos entre AG) de ácidos grasos en la fracción neutra y polar de la microalga <i>Chaetoceros muelleri</i>	51
Tabla VII. Proporción (%) de ácidos grasos en LN de semilla de ostión <i>C. gigas</i> a temperatura control y sometida a estrés térmico.	59
Tabla VIII. Proporción (%) de ácidos grasos en LP de semillas de ostión a temperatura control y sometida a estrés térmico.	60
Tabla IX. Proporción (%) de átomos de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ en LN.....	63
Tabla X. Proporción (%) de átomos de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ en LP.	63

Nomenclatura

ARA	Ácido araquidónico
CG-C-IRMS	Cromatógrafo de gases-combustión-espectrómetro de masas de relaciones isotópicas.
CG-FID	Cromatógrafo de gases con detector de ionización a la flama.
COX	Ciclooxigenasa
FL	Fosfolípido
FLA2	Fosfolipasa A ₂
IsoPs	Isoprostanos
LN	Lípidos neutros
LP	Lípidos polares
MC	Membrana celular
PGE2	Prostaglandina tipo E de la serie 2
PGEM	Estándar comercial del metabolito de Prostaglandina tipo E
PGF2 α	Prostaglandina tipo F de la serie 2, configuración alfa
PGs	Prostaglandinas
TG	Triglicéridos

1. INTRODUCCIÓN

El ostión japonés (*Crassostrea gigas*) es el molusco bivalvo de mayor importancia en la acuicultura a nivel mundial (FAO, 2016). Es originario de las costas de Asia, y se ha introducido a diversas regiones del mundo con fines de cultivo, incluso en zonas fuera de su rango longitudinal. Sin embargo, es susceptible a fuertes mortalidades (hasta 80%) en los meses cálidos, lo que se conoce como “mortalidad de verano” y que ha causado cuantiosas pérdidas económicas, tanto en estadio de semilla como en adultos de ostión (Samain *et al.*, 2007). La mortalidad de verano se ha relacionado entre otros, a factores ambientales y principalmente, a la temperatura, que determina la tasa metabólica de estos organismos poiquiloterms. Cuando un molusco es sometido a un incremento de temperatura estresante, se activan mecanismos de supervivencia que están regulados por la secreción de prostaglandinas (PG), producidas por dos vías: 1) Enzimática: El estrés conlleva una producción enzimática de PG a partir del ácido araquidónico (ARA) presente en fosfatidilinositol de los fosfolípidos; el ARA es liberado por medio de la fosfolipasa A₂ y transformado en PG por medio de la enzima ciclooxigenasa (COX) (Tsai y Kulmacz, 2010). 2) No enzimática: PG resultante de un incremento del metabolismo ante un aumento de temperatura, lo cual aumenta la producción de especies reactivas al oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). Durante el metabolismo basal, gran parte de los ROS son neutralizados, pero cuando el metabolismo es alto y prolongado como durante un estrés térmico crónico o repetitivo, los ROS producen oxidación de ácidos grasos de la membrana celular, lo cual conlleva a productos lipídicos de oxidación similares a PG que producen una serie de respuesta no reguladas que pueden causar la muerte del organismo. Se ha observado en trabajos previos que algunos organismos acumulan preferentemente el ARA en los triglicéridos (TG) y no en fosfolípidos: Es posible que así eviten la producción no enzimática de PG.

En la presente tesis se pretende evaluar si almacenar ARA en TG y movilizarlos a fosfolípidos solo cuando se requiere producir PG por vía enzimática podría ser un mecanismo de regulación de la cantidad de ARA en los fosfolípidos relacionado con la protección ante los efectos de ROS en semillas de *C. gigas* ante un incremento crónico de la temperatura.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades del ostión japonés *Crassostrea gigas*

Crassostrea gigas es un molusco bivalvo comúnmente conocido como ostión Japonés u ostra del Pacífico. Es una especie nativa de las costas de Asia, sin embargo, se ha introducido en diversas regiones del mundo con fines de cultivo. La clasificación taxonómica del ostión japonés de acuerdo con la WoRMS (2019) es la siguiente:

Reino: Animalia

Phylum: Mollusca

Clase: Bivalvia

Subclase: Pteriomorpha

Orden: Ostreida

Superfamilia: Ostreoidea

Familia: Ostreide

Género: *Crassostrea*

Especie: *Crassostrea gigas*

La identificación de esta especie tradicionalmente se ha basado en los caracteres fenotípicos, siendo la primera característica que se percibe la morfología de su concha, sin embargo, dada la alta plasticidad fenotípica de la especie, las herramientas moleculares se han usado más recientemente para su identificación (Harris, 2008). *C. gigas* posee una concha rugosa y elongada que puede alcanzar una longitud total de 20-30 cm. Posee dos valvas desiguales en tamaño y forma (Fig. 1). La valva izquierda tiene forma cóncava, la valva derecha es plana o

ligeramente convexa y se apoya dentro de la valva izquierda. Al interior de la concha se encuentra el manto cubriendo el resto de los tejidos, el cual se relaciona con procesos de calcificación de la concha. Entre los dos lóbulos del manto esta la cavidad paleal, un espacio libre dividido por las branquias hacia una parte inhalante y otra exhalante donde ocurre la circulación del agua de mar (no hay sifones) inducida por la actividad ciliar de las branquias. Además de extraer el oxígeno para la respiración, las branquias actúan como un filtro que retiene materia particulada. La boca, la cual está rodeada por los palpos labiales está cerca de la charnela y el ano esta justo sobre el musculo abductor (ICES, 2009).

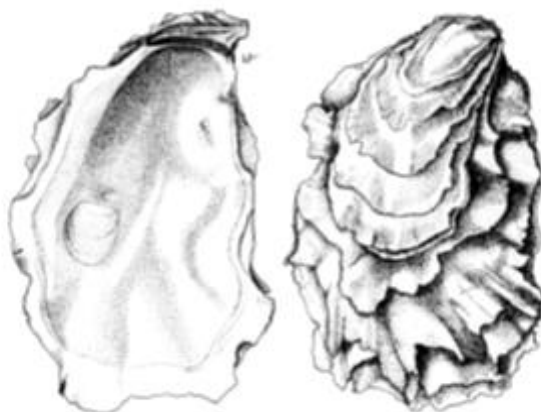


Figura 1. Morfología de la concha del ostión japonés *Crassostrea gigas*. Valva interior mostrando la cicatriz del musculo abductor (izquierda) y valva exterior (derecha). Tomado de FAO (2012).

2.1.1 Hábitat

El ostión japonés es una especie que en su etapa adulta se encuentran adheridos a sustratos firmes como rocas o conchas, e incluso sobre otros ostiones formando bancos, se les encuentra desde la zona intermareal y hasta una profundidad de 40 m. El rango salino óptimo para esta especie de ostión es de 20 y 25‰, se ha reportado que puede tolerar salinidades menores de 10‰ y superiores a 35‰, sin embargo; a estas salinidades se ve afectado el crecimiento. Su rango de temperatura es, al igual que el salino muy amplio, gracias a la capacidad de este organismo de aclimatación (Cognie *et al.*, 2006; FAO, 2009).

2.1.2 Alimentación

C. gigas es un organismo filtrador, su dieta natural consiste principalmente en partículas de materia orgánica, incluido el fitoplancton. La composición específica de la dieta y la proporción de los componentes depende grandemente de las condiciones ambientales y el lugar (aguas estuarinas o aguas oceánicas). El ostión tiene la habilidad de filtrar y seleccionar partículas por tamaño a nivel de las branquias y los palpos labiales. Las partículas para ingestión son transportadas hacia la boca por medio de la secreción de moco y acción de los cilios, mientras que las partículas no deseadas son aglomeradas y desechadas antes de ser ingeridas como pseudo-heces junto con las heces resultadas de la actividad digestiva (FAO, 2004).

2.1.3 Reproducción y crecimiento

C. gigas es un organismo ovíparo con un alto nivel de fecundidad. Estos organismos tienen la capacidad de cambiar de sexo a lo largo de su vida, usualmente desovan primeramente como machos y subsecuentemente como hembras. La gametogénesis se presenta con una temperatura de 10°C y un rango de salinidad que va entre 15 y 32‰. Por otro lado, el desove requiere una temperatura más alta, generalmente a una temperatura superior a los 20°C. *C. gigas* es una especie que presenta altos índices de fecundidad. Una hembra de entre 8 y 15 cm puede producir hasta 200 millones de huevos en un desove. Las larvas se alimentan de plancton y se les encuentra en la columna de agua. La longitud de la concha varía para cada etapa, en la etapa prodisoconcha ésta mide 70 µm, en esta etapa, pasa de encontrarse en la columna de agua a arrastrarse usando el pie larval. Cuando alcanzan una longitud entre 300 y 340 µm estos organismos se fijan a un sustrato adecuado, el de búsqueda de sustrato para fijación puede tener una duración que varía entre 2 y 3 semanas, dependiendo de los factores fisicoquímicos del agua y otros factores como la alimentación. Así mismo, es en esta etapa donde las larvas pueden ser dispersadas por las corrientes marinas. Una larva madura de *C. gigas* se fija al sustrato de forma permanente. Cuando el organismo está asentado, podemos hablar de juveniles o semilla de ostión (GISD, 2015).

2.2 Cultivo de *Crassostrea gigas*

De acuerdo con la FAO (2018), para el año 2016 la producción mundial acuícola considerando la maricultura y acuicultura costera fue de 28 mil millones de toneladas de peso vivo, de las cuales casi 17 millones de toneladas (58% del total) corresponden al grupo de los moluscos, seguido de los peces con 6 millones de toneladas (23% del total) y crustáceos con casi 5 mil toneladas (17% del total) (Fig. 2).

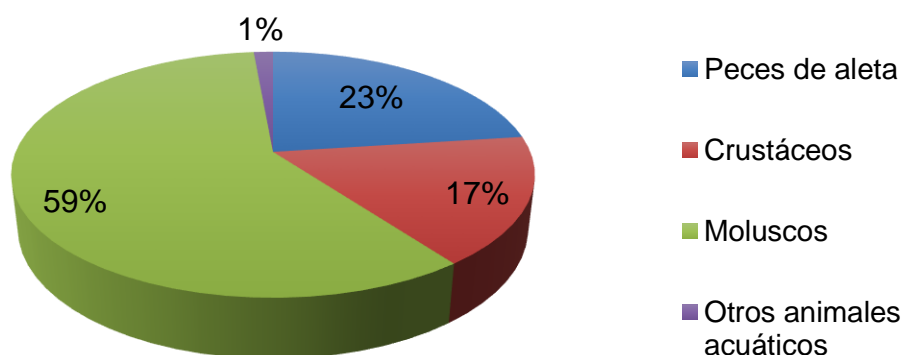


Figura 2. Producción acuícola mundial del año 2015, considerando los organismos de ambientes marinos y costeros (FAO, 2016).

Del total de la producción de moluscos de todos los ambientes para el año 2015, el grupo de los ostiones ocupa el segundo lugar aportando el 36% del total, después de las almejas que aportan un porcentaje similar con una producción con 37% del total. Con menor aporte se encuentran el grupo de los pectínidos y mejillones con el 14 y 13%, respectivamente (Fig. 3) (FAO, 2018).

Dentro del grupo de los ostiones, la especie de ostión más cultivada a nivel mundial es *Crassostrea gigas*, especie originaria de las costas de Asia que se introdujo a diversas regiones del mundo para su cultivo. Se ha elegido sobre otras especies de ostras nativas por poseer un rápido crecimiento y amplios rangos de tolerancia a factores ambientales (FAO, 2009). En el año 2016, se produjeron a nivel mundial 573,617 toneladas de *Crassostrea gigas* (Fig. 4), lo que en valor económico representó 1,163,895 de USD (Estadísticas de pesca y acuicultura, 2010, 2015 y

2016). Los principales países productores de ostión históricamente son: China (82% de la producción mundial total), Corea, Japón, Estados Unidos, Francia y México (FAO, 2015).

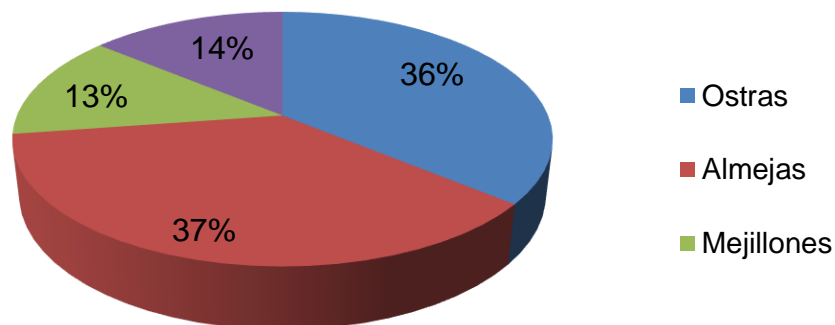


Figura 3. Producción mundial de moluscos y principales grupos cultivados (2015) (FAO, 2018).

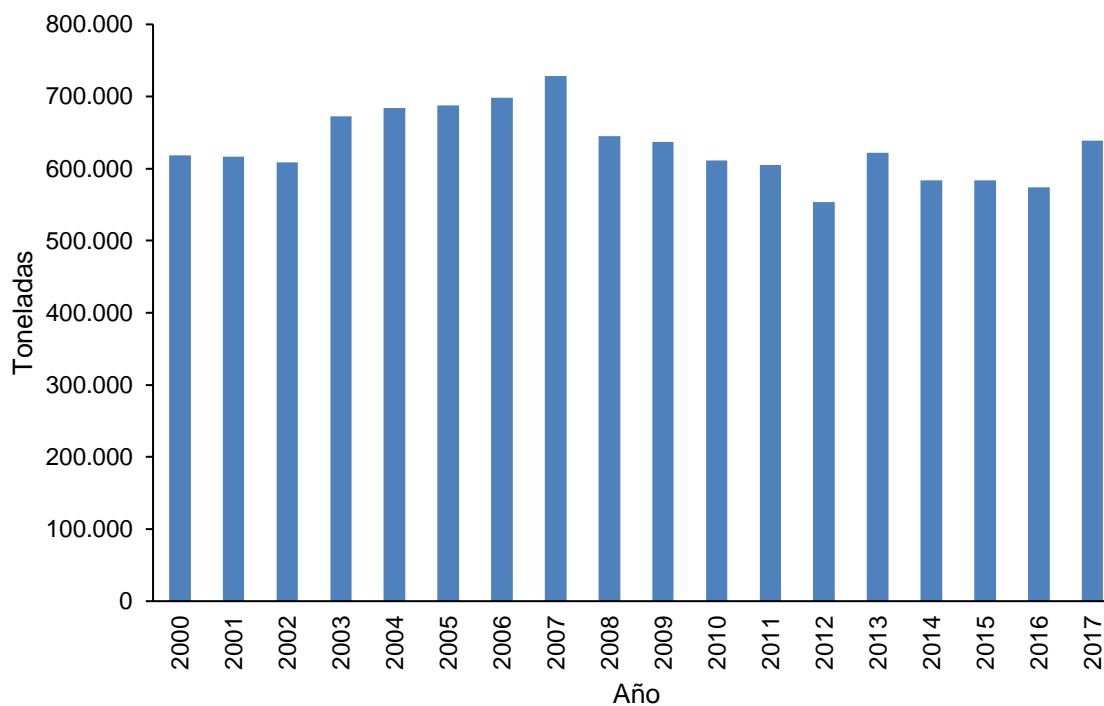


Figura 4. Producción mundial por acuicultura de *C. gigas* en los últimos años (Estadísticas de pesca y acuicultura, 2000-2017).

2.2.1 Cultivo de ostión en México

En México existe una producción acuícola de ostión importante conformada por diversas especies: *Crassostrea gigas* en el océano Pacífico, en las costas del estado de Baja California, Baja California Sur, Sonora y Sinaloa, principalmente. *Crassostrea virginica* se cultiva el Golfo de México, y *Crassostrea corteziensis* en las costas del estado de Nayarit (Tabla I). En conjunto, generan una producción acuícola aproximada de 50 mil toneladas anuales (Fig. 5), siendo *C. gigas* es la especie de molusco más importante en términos económicos en México (Anuario estadístico de acuicultura y pesca, 2015).

Tabla I. Especies de ostión de importancia comercial en México.

Especie	Nombre común	Tipo de producción
<i>Crassostrea virginica</i>	Ostión americano	Captura y cultivo
<i>Crassostrea iridescens</i>	Ostión de piedra	Captura
<i>Crassostrea corteziensis</i>	Ostión de placer	Captura y cultivo
<i>Crassostrea rizophora</i>	Ostión de mangle	Captura
<i>Crassostrea gigas</i>	Ostión japonés	Cultivo
<i>Ostrea angelica</i>	Ostión angélico	Captura
<i>Ostrea fisheri</i>	Ostión de roca	Captura
<i>Crassostrea palmula</i>	Ostión de mangle	Captura
<i>Crassostrea sikamea</i>	Ostión Kumamoto	Cultivo

La mayoría de las especies son habitantes típicos de los esteros, desembocaduras de ríos y lagunas costeras, por lo que son organismos muy resistentes que toleran amplios cambios en los factores ambientales (Arriaga-Becerra y Rangel-Dávalos, 1988). *C. gigas* se cultiva en el estado de Baja California, Baja California Sur, Sonora, Sinaloa, Nayarit y Oaxaca, ocupando Baja California Sur en el 2010 el segundo lugar en producción por acuicultura, después de Baja California Norte, con 665 toneladas (Carta Nacional Acuícola, 2012).

2.2.2 Arte de cultivo en México

Las artes de cultivo que se utilizan para el cultivo de ostión varían dependiendo de la etapa en la que se encuentra el organismo (Fig. 6). Uno de ellos, son las sartas, que consisten en sustratos calcáreos como conchas seleccionadas, perforadas, y previamente lavadas. Las conchas se atan entre sí con amarres en cada una de ellas para asegurar el soporte y manteniendo una distancia entre cada concha (Tapia-Vázquez *et al.*, 2008). Otros productores prefieren el uso de otros artes de pesca, como las canastas tipo “Nestier”, con ellas se forman los denominados “módulos”, que consisten en canastas apiladas una sobre otra, y en la parte superior se sujeta un flotador con el fin de mantener las canastas suspendidas dentro de la columna de agua y sujetas a las líneas madres. Otro sistema muy utilizado en México es usando costales y camas de cultivo en la zona intermareal (CONAPESCA, 2016).

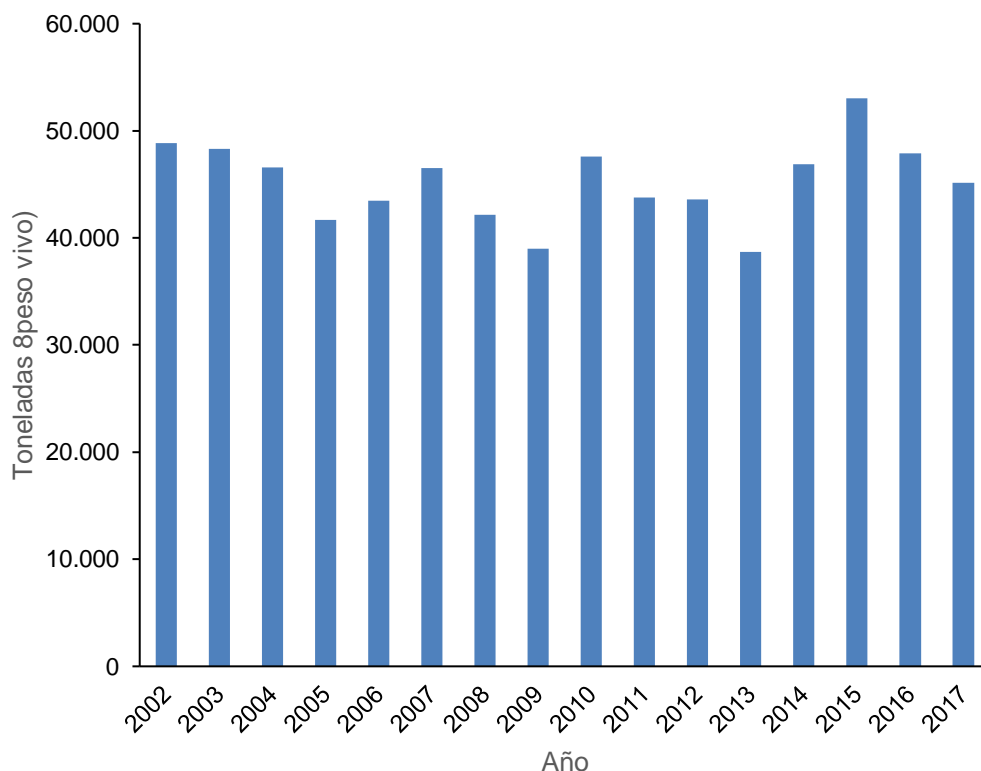


Figura 5. Producción de ostión por acuacultura en México en los últimos años (SAGARPA, Anuario estadístico de acuacultura y pesca, 2002-2017).

2.2.3 Introducción de *C. gigas* a México

El ostión japonés fue introducido a México en el año de 1973 (Islas-Olivares, 1975), representando este suceso un avance muy importante en el ámbito del cultivo de moluscos en México. Las primeras semillas cultivadas en México dieron muy buenos resultados en términos de crecimiento y supervivencia, específicamente, en las costas de Baja California y Sonora, en vista de los buenos resultados obtenidos para esa región, el gobierno de México fomentó en gran medida el desarrollo de nuevos proyectos de cultivo de esta especie de ostión con fines de comercialización en otras regiones del pacífico mexicano (Islas-Olivares, 1975).

En nuestra entidad, Baja California Sur (B.C.S.) el ostión japonés se ha cultivado desde las costas de Guerrero Negro, el cual se localiza dentro del municipio de Mulegé y hasta el estero Rancho Bueno, el cual pertenece al municipio de La Paz, y se localiza el sur de la entidad. El cultivo de *C. gigas* en B.C.S. se realiza hasta el momento, en las costas del océano pacífico (Islas-Olivares, 1975).

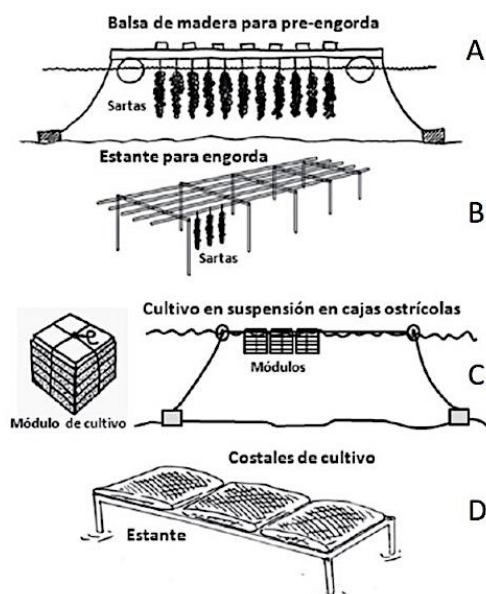


Figura 6. Ilustración de los principales sistemas de cultivo de *C. gigas* en México. (A), sartas para engorda, (B) estantes para engorda, (C) módulos de

cultivo de cultivo con cajas ostrícolas también llamadas canastas Nestier, (D) sacos de cultivo sobre camas. Tomado de Chávez-Villalba (2014).

2.2.4 Mortalidad de verano

A pesar del éxito del cultivo de esta especie, se han reportado a nivel mundial mortalidades masivas de *C. gigas* (Tabla II), especialmente durante los meses cálidos, suceso que se ha llamado “mortalidad de verano” (Samain *et al.*, 2007). Dicho evento se ha reportado tanto para organismos silvestres como para ostiones en cultivo, lo que ha generado una preocupación creciente por su impacto en la acuicultura. Este fenómeno afecta a organismos de cualquier etapa, desde semillas hasta adultos y reproductores, generando cuantiosas pérdidas económicas (Chávez-Villalba *et al.*, 2007).

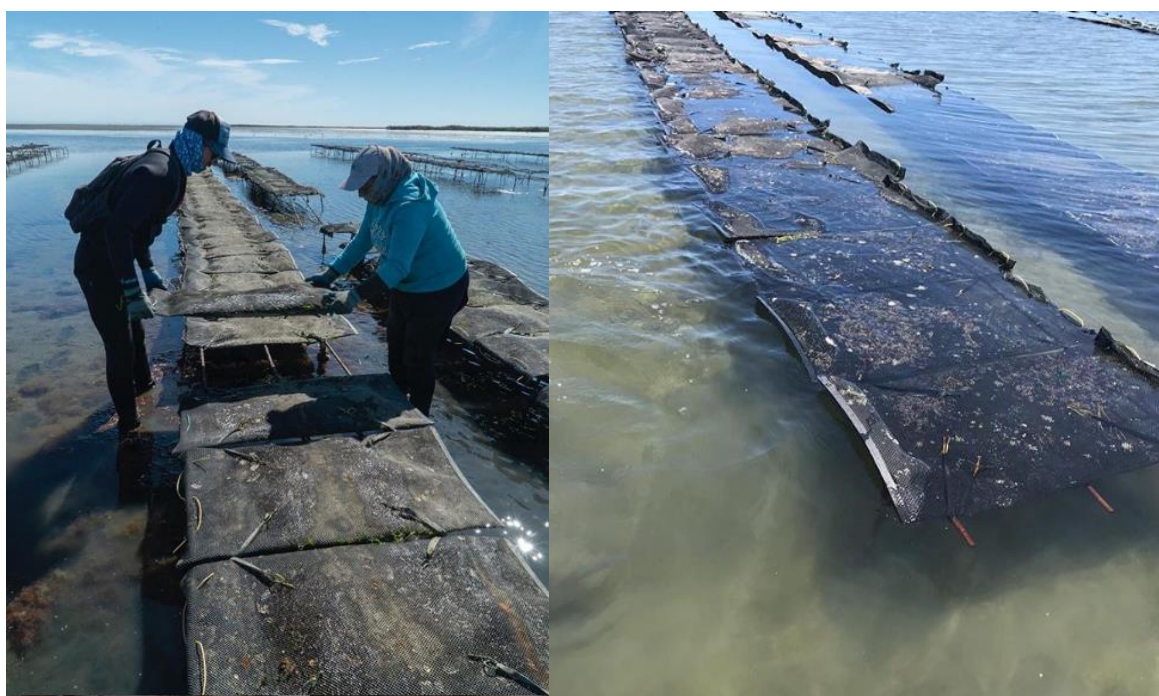


Figura 7. Costales (bolsa de malla vexar) suspendidos sobre camas en el estero “El Cardón, San Ignacio. B.C.S. Fuente: Sol Azul Oysters.

En la literatura existen discrepancias sobre el primer reporte de mortalidad de verano, algunos autores señalan que se dio en las costas de Japón en 1915, mientras que otros consideran el primer reporte en el año de 1945 (Koganezawa,

1974). Más tarde, se siguieron reportando más casos en Japón y en América, específicamente en Estados Unidos, donde se introdujo a la costa occidental en la década de los 20s. En 1940 se asocia un protozooario parasitario de ostión llamado *Perkinsus marinus* a eventos de mortalidad de verano en E.U.A. (Cáceres-Martínez *et al.*, 2016).

Tabla II. Resumen de reportes de mortalidad de verano alrededor del mundo.

Año	Suceso
1915	Primer reporte de mortalidad en Japón (Soletchnik <i>et al.</i> , 2005).
1940	Se descubrió <i>Perkinsus marinus</i> asociado a un evento de mortalidad masiva de ostión en el río Misisipi, Luisiana, E.U.A. (Cáceres Martínez <i>et al.</i> , 2016).
1945	Se señala que la mortalidad de verano de <i>C. gigas</i> comenzó en 1945 en las costas de Japón (Samain <i>et al.</i> , 2007).
1950	Registros de mortalidad de <i>C. gigas</i> en Canadá, no se estableció la causa (Cassis <i>et al.</i> , 2011).
1958	Se reportaron eventos de mortalidad en E.U.A. en los estados de Washington, California y en Columbia Británica (Samain <i>et al.</i> , 2007).
1970	Introducción de <i>C. gigas</i> a Francia a principios de los años los 70's para reemplazar a <i>C. angulata</i> (Gouletquer <i>et al.</i> , 1998).
1976	Evento de mortalidad masiva en Francia (Patrick <i>et al.</i> , 2006).
1982	1982-1983: Evento de mortalidad masiva en Arcaron Bay, Francia (Patrick <i>et al.</i> , 2006).
1988	Evento de mortalidad masiva (41%) en el sur de la Bahía Mareness-Oleron, Francia (Gouletquer <i>et al.</i> , 1998).
1991	Evento de mortalidad masiva de <i>C. gigas</i> asociado por primera vez a la presencia de Herpes-Virus se reportó en verano de este año en Francia (Solomieu <i>et al.</i> , 2015).
1993	Evento de mortalidad (60-100%) en larvas de <i>C. gigas</i> en Auckland (Nueva Zelanda) asociado a herpes virus.
1993	Evento de mortalidad de semilla de <i>C. gigas</i> en Tomales Bay, E.U.A., desde 1993 (Burge <i>et al.</i> , 2006).
1994	Evento de mortalidad masiva en Bretaña y Normandía, Francia (Patrick <i>et al.</i> , 2006).
1997	Reportes de evento de mortalidad de ostión en México (Vásquez-Yeomans <i>et al.</i> , 2004).
2008	Reportes de mortalidad de verano en áreas de producción en Francia y en la República de Irlanda (Renault, 2011).
2009	Reportes de mortalidad de verano en áreas de producción de <i>C. gigas</i> en Francia y Jersey, una isla en Normandía (Renault, 2008).
2010	Reportes de mortalidad de verano en Francia, Irlanda y en una localidad de Reino Unido (Renault, 2011).

En Europa, Francia fue el primer país en introducir *C. gigas* en 1966 con fines de cultivo para sustituir a la especie nativa *C. angulata*, y los reportes de mortalidad

comenzaron a partir de 1985 (Soletchnik *et al.*, 2007). En otros países europeos como en Irlanda, donde se introdujo *C. gigas* para remplazar a *Ostrea edulis* el primer reporte se presentó en el año de 1993, y desde ese tiempo las mortalidades han ocurrido esporádicamente (Cotter *et al.*, 2010).

En México, se introdujo *C. gigas* para fines de cultivo en el año de 1973 en Bahía Falsa, Ensenada, B.C. (Islas-Olivares, 1975). Los episodios de mortalidad comenzaron unos años más tarde, en 1977 en el estado Baja California y posteriormente se extendió a Sonora y Baja California Sur. Un resumen con los principales eventos de mortalidad de *C. gigas* en México se muestra en la Tabla III.

Tabla III. Principales estudios realizados sobre el ostión japonés *Crassostrea gigas* en México a partir de su introducción en 1972.

Año	Suceso
1975	Inicia cultivo piloto de ostión Japonés <i>C. gigas</i> , así mismo, la Sociedad cooperativa Ensenada obtuvo una concesión para explotar el recurso ostión en Bahía San Quintín, B.C. (Islas-Olivares, 1975).
1976	Iniciaron los primeros cultivos experimentales de ostión <i>C. gigas</i> en B.C.S (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeoamans, 2013).
1979	Se realiza estudio socioeconómico en Puerto Don Juan, B.C. con resultados positivos (Islas-Olivares, 1982). Inició cultivo experimental de <i>C. gigas</i> en Las Guásimas, Sonora (Fimbres-Peña, 1980).
1980	Se construyó la Sociedad Cooperativa de Producción Pesquera Bahía Falsa (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeoamans, 2013). Inició cultivo comercial de <i>C. gigas</i> en Las Guásimas, Sonora. (Fimbres-Peña 1980).
1981	Inició cultivo de <i>C. gigas</i> con semillas de San Francisco en el estero "La Atanasia", Son (Ochoa-Araiza y Fimbres-Peña, 1984).
1996	El Laboratorio de Ciencias Marinas de la UAG realiza cultivos experimentales de <i>C. gigas</i> en Laguna Barra Natividad, Jalisco En: Gallo-García <i>et al.</i> , (2001). 1996-1997: Estudio del ciclo reproductivo de <i>C. gigas</i> en Bahía Falsa (Cáceres-Martínez, 2001). 1976-1977: Se construyó el primer laboratorio de producción de larvas (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeoamans, 2013).
1997	Reporte de mortalidad de ostión en el estado de Sonora y B.C.S. En: Vásquez-Yeoamans <i>et al.</i> (2004).
1998	Se reportan mortalidades inusuales de <i>C. gigas</i> (>80%) en Bahía Falsa, B. C. En: Vásquez-Yeoamans, 2004).
1999	A partir de un estudio realizado en este año, se dan a conocer los signos clínicos e histopatológicos de mortalidades de ostión relacionadas con un virus. En: Cáceres-Martínez <i>et al.</i> , 2004).
2000	Se realizó engorda de <i>C. gigas</i> obteniendo alentadores resultados que muestran que esta especie puede crecer satisfactoriamente en la Laguna de Barra Natividad, Jalisco en la temporada de invierno - primavera (Gallo-García <i>et al.</i> , 2001).
2001	Se realiza un estudio sobre la caracterización fisiológica y bioquímica de bacteria aisladas de las branquias del ostión recolectados durante el episodio de mortalidad de este año en Bahía Falsa, B.C. (Vásquez-Yeoamans <i>et al.</i> , 2004).
2003	Se lleva a cabo un estudio en Barra de Natividad, Jalisco para eliminar los gusanos poliquetos que afectan al ostión (Gallo García <i>et al.</i> , 2004; Gallo-García <i>et al.</i> , 2007). Se confirma la presencia de un virus por medio de microscopía electrónica. En: Cáceres-Martínez y Gallo-García (2004). Se realizó un estudio sobre el estado fisiológico del ostión durante la mortalidad (Reproducción, Índice de condición, etc.) en Laguna "El Soldado", Sonora (Chávez-Villalva <i>et al.</i> , 2007).
2004	Se realizó estudio para evaluar el crecimiento y la supervivencia del ostión en cultivo en el estero La Piedra (Sinaloa) durante un ciclo de engorda de 2004-2005 (Góngora-Gómez <i>et al.</i> , 2012).
2005	Estudio comparativo del crecimiento, condición y supervivencia de juveniles de ostión juveniles <i>C. gigas</i> y <i>C. corteziensis</i> en Las Guásimas, Sonora (Castillo-Duran <i>et al.</i> , 2010).
2006	Estudio del crecimiento y supervivencia de ostión cultivado en La Cruz durante mortalidades, dichas mortalidades masivas (80%) se presentaron en juveniles en cultivo en granjas de la Laguna La Cruz (Sonora) y mortalidades masivas (70-90%) en ostiones de todas las tallas en otras áreas de cultivo de las costas de Sonora En: Chávez-Villalva <i>et al.</i> (2010). Se llevó a cabo un estudio sobre la presencia de <i>Perkinsus marinus</i> en diferentes sitios de cultivo de ostión a lo largo de la costa de Sonora durante un evento de mortalidad (Enríquez-Espinoza <i>et al.</i> , 2010).

Varios factores causales han sido descritos para tratar de explicar las mortalidades de verano. Diversos estudios consideran agentes estresores ambientales, principalmente la elevada temperatura del agua, salinidad y disponibilidad de alimento (fitoplancton) (Soletchnik *et al.*, 2005; Burge *et al.*, 2006; Soletchnik *et al.*, 2007). Por otro lado, entre los factores biológicos pueden estar la presencia de patógenos como virus, bacterias y parásitos (Cáceres-Martínez *et al.*, 2018). Por último, el esfuerzo reproductivo y los factores relacionados con la genética han sido ampliamente estudiados en Francia (Samain y McCombie, 2008). Considerando lo anterior, la mortalidad de verano probablemente implica una compleja interacción entre factores abióticos y bióticos, y probablemente no puede ser explicada por un solo factor.

La mortalidad de verano puede ocurrir en organismos en etapa de semilla, juveniles o adultos. Mortalidades masivas de ostión han sido reportadas comúnmente en organismos adultos, sin embargo, también hay reportes en organismos en etapa de semilla durante los meses que la temperatura del agua es más cálida. Esta pérdida ha sido atribuida a la mortalidad de verano, sin embargo, investigaciones recientes sugieren diferencias entre la mortalidad de verano de adultos y las mortalidades en semilla. La mortalidad en semilla típicamente afecta a los animales más pequeños, es corta en duración y ha sido asociada con temperaturas cálidas del agua y al herpes virus de ostión (Renault *et al.*, 2000; Friedman *et al.*, 2005; Burge *et al.*, 2006).

2.3 Estrés térmico

Existen un gran número de definiciones para estrés que han ido variando a través de los años: inicialmente se incluía en la definición el concepto de homeostasis, término acuñado por Claude Bernard en 1960 como “la capacidad que tiene el organismo para mantener reguladas sus condiciones internas”, y que más tarde Walter Canon usó para describir los mecanismos que mantienen constantes las condiciones del medio interno de un organismo, a pesar de grandes oscilaciones en el medio externo (Goldstein y Kopin, 2007). El estrés es un estado en el que la

homeostasis de un organismo se ve amenazada por fuerzas adversas intrínsecas o extrínsecas a los que se les denomina factores estresantes, y el cual es contrarrestado por un intrincado repertorio de respuestas que van desde respuestas el nivel molecular hasta el comportamental con el objetivo de mantener o reestablecer la homeostasis del organismo (Tsigos, 2016).

La temperatura es un factor externo que juega un papel muy importante en la fisiología de los seres vivos y en los invertebrados marinos determina la tasa metabólica y la distribución geográfica de los mismos (Carrasco y Barón, 2010). Los invertebrados marinos son organismos poiquiloterms, es decir, son incapaces de regular su temperatura corporal como lo harían los homeotermos, sino que ésta varía con la temperatura del medio externo, todo esto, dentro de ciertos límites a los cuales se les conoce como temperatura crítica: si estos límites son sobrepasados y dependiendo de la duración de exposición, pueden experimentar estrés térmico e incluso, el organismo puede llegar a morir. Los límites de tolerancia pueden estar dados por el entorno físico habitado por la especie o población y están además influenciados por las respuestas fisiológicas a la temperatura y a los cambios térmicos en la estructura y función macromolecular (Whiteley y Mackenzie, 2016).

La fluctuación termal natural del ambiente marino induce cambios fisiológicos en los ectotermos que requieren ajustes moleculares y de expresión de genes (Zhang *et al.*, 2019). Existen un gran número de estudios que muestran que una de las principales respuestas de los organismos a un choque térmico, entre otros factores estresantes, implica un cambio en la transcripción génica y la traducción de proteínas de choque térmico (HSP, por sus siglas en inglés) (Snyder *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2017). Las HSP son proteínas funcionales encontradas en todos los organismos (desde bacterias hasta animales) es decir, se encuentran altamente conservadas y juegan un papel esencial en la mediación de una respuesta contra los efectos no solo de la temperatura, sino a otros estresores físicos y químicos, como trauma de tejidos, toxicidad a metales pesados, radiación, infección y cambios normales asociados con el desarrollo o diferenciación celular (De la Re Vega *et al.*, 2017). La medición de HSP ha sido usada para evaluar la respuesta fisiológica del

ostión bajo condiciones de estrés (Yang *et al.*, 2016). La temperatura altera la conformación y estabilidad de las proteínas. Dado que las proteínas deben ser suficientemente lábiles para interactuar con sus sustratos, son altamente susceptibles a estrés desnaturalizantes de proteínas como un pH intracelular reducido o temperatura elevada (Hamdoun *et al.*, 2003). Consecuencia de los estresores desnaturalizantes como la temperatura sobre las proteínas resulta en la exposición de los dominios hidrofóbicos que puede causar interacciones no específicas de proteínas. Bajo estas condiciones de estrés, las HSP, también conocidas como chaperonas moleculares, son requeridas para estabilizar el dominio proteico hidrofóbico expuesto al ambiente celular acuoso durante la síntesis de proteínas y la translocación (Hamdoun *et al.*, 2003).

Existen dos tipos de expresión de HSP: 1. La expresión constitutiva, la cual se refiere a una transcripción permanente, independientemente de las condiciones ambientales y 2. La expresión inducible, la cual aumenta en respuesta a un cambio ambiental. La expresión de HSP inducida por estrés, contribuye dramáticamente a la tolerancia a condiciones que de otra manera serían letales; a esto se le conoce como termotolerancia inducida (Hamdoun *et al.*, 2003).

La familia de HSP posee moléculas cuyo peso molecular varía entre <10 k Da a más de 100 k Da y se clasifican de acuerdo a su masa molecular (Yang *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2017). La HSP90 posee un peso molecular de 85-90 k Da. A pesar de que la familia de HSP90 ha sido caracterizada en un amplio rango de organismos, esta ha sido mucho menos investigada que la HSP70 en moluscos, especialmente en *C. gigas*. La familia de HSP90, la cual ha sido reportada en todos los organismos, es la menos entendida en la mayoría de las HSP en términos de su función celular (Kim *et al.*, 2017). Por otro lado, la HSP70 posee un peso molecular de 68-72kDa y ha mostrado ser la familia primaria de HSP que responde al estrés térmico (Kim *et al.*, 2017). El papel y expresión de las HSP70 ha sido intensamente investigado en el bento marino, como los moluscos y cnidarios. Además, las características básicas de las HSP con inducción de la termotolerancia en el ostión

C gigas han sido bien definidas. La familia de las HSP70 es la más conservada y grande de todas (Castillo-Valenzuela *et al.*, 2015).

Por otro lado, a temperatura ambiental elevada también incrementa las tasas de las reacciones bioquímicas y procesos biológicos en poiquilotermos (Kim *et al.*, 2017) tales como la glucólisis, metabolismo de la mitocondria y la cadena respiratoria (Anestis *et al.*, 2007) lo cual afecta la tasa metabólica y a su vez, causa un incremento en el consumo de oxígeno por los tejidos del organismo que a su vez implica una producción alta de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Abele, 1998). Los ROS son producidos de forma natural durante el metabolismo oxidativo, durante la respiración celular y estos incluyen: anión superóxido (O_2^-) peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($HO\cdot$) y oxígeno singlete (O_2) (Pil *et al.*, 2008). En condiciones normales, existe un balance entre la producción de ROS y producción de antioxidantes. Cuando el estrés térmico es fuerte o prolongado, se produce una gran cantidad de ROS, causando un desbalance entre estos sistemas, es entonces cuando se presenta el daño oxidativo que puede causar peroxidación lipídica, oxidación de proteínas y daño al ácido desoxirribonucleico (ADN). Para mantener la homeostasis y evitar el daño oxidativo, los organismos han desarrollado mecanismos de defensa antioxidantes que incluyen mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. Dentro del primer grupo, encontramos a las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión-s-transferasa (GST). La Superóxido dismutasa (SOD) es una enzima que cataliza la remoción del radical superóxido (O_2^-) produciendo peróxido de hidrógeno y agua como productos finales. Por otra parte, la Glutatión peroxidasa (GPx) remueve el peróxido de hidrógeno al acoplar su reducción con la oxidación del glutatión (GSH) como sustrato. La GPx también puede reducir otros peróxidos como son los hidroperóxidos. Las enzimas antioxidantes juegan un papel muy importante en la protección celular y mantenimiento de la homeostasis evitando el daño oxidativo (Park *et al.*, 2009; An y Choi, 2010).

Además de cambios en la célula, durante una exposición a un estrés de temperatura la hemolinfa de los bivalvos adquiere la temperatura del medio externo,

por lo tanto, los hemocitos, células involucradas en los mecanismos de defensa de los bivalvos y que se encuentran en la hemolinfa están expuestos a variaciones de temperatura que ocurren en el ambiente (Malham *et al.*, 2009). Una temperatura elevada del agua puede inhibir la dispersión de hemocitos y la locomoción en el ostión *C. virginica*, mientras que fluctuaciones en la temperatura puede afectar el conteo de hemocitos y la actividad fagocítica en *O. edulis* y *Ruditapes philippinarum* (Gagnaire *et al.*, 2006). Los hemocitos son responsables del reconocimiento, migración y fagocitosis de microorganismos extraños (Malham *et al.*, 2009). En *C. gigas*, dos tipos de hemocitos pueden ser diferenciados con base en sus características morfológicas: hialinocitos y granulocitos. Los hemocitos también contienen enzimas hidrolíticas y producen ROS, los cuales juegan un papel clave en la degradación de patógenos. Los hemocitos han sido usados como indicadores de la capacidad inmune en muchas especies de bivalvos (Gagnaire *et al.*, 2006). El estrés térmico puede afectar significativamente estos mecanismos de defensa.

2.4 Prostaglandinas (PG)

Tanto la expresión de HSP, como la respuesta inmune están mediadas por prostaglandinas (PG) (Tokuda *et al.*, 2002). Las PG son una subclase de eicosanoides producidas por vía de las enzimas ciclooxigenasa (COX), en este grupo también se incluyen además de las PG que fueron las primeras en describirse, a los leucotrienos (LT) y lipoxinas (LX) las cuales se producen por la vía de las enzimas lipooxigenasas (LOX). Los eicosanoides son importantes mediadores lipídicos y como su nombre lo indica, son compuestos de 20 carbonos que se derivan a partir de los ácidos grasos esenciales, principalmente del ácido araquidónico (ARA) (Cuthbert, 2016). El ARA generalmente no se encuentra en su forma libre en grandes cantidades, sino que se encuentra almacenado en forma esterificada ocupando la posición 2 del glicerol de los fosfolípidos de membrana, específicamente del fosfatidilinositol. Para ser usado para la biosíntesis de PG, la fosfolipasa A₂ (FLA₂) es la encargada de liberar el ARA de su posición 2 (Bell y Sargent, 2003). La FLA₂ se activa cuando los tejidos están expuestos a diversos

estímulos fisiológicos, como factores de crecimiento, hormonas o citoquinas (Dennis, 2000; Harizi *et al.*, 2008). Posteriormente, el ARA es oxidado por la COX, que posee dos sitios activos, es decir, actúa como una ciclooxigenasa y como una peroxidasa. Como ciclooxigenasa transforma el ARA libre en PG del tipo 2 (PGG₂) el cual es un intermediario; posteriormente la PGG₂, es reducida por la prostaglandina H sintetasa para formar PGH₂ (PG=prostaglandinas, H=hidroxilo, 2=dos dobles enlaces), y ésta es isomerizada para formar las distintas PG maduras (PGD₂, PGE₂, PGF₂ y PGI₂) (Buczynski *et al.*, 2009) (Fig. 8). Las PG producidas por esta vía se les conoce en su conjunto como prostanoides y se clasifican de acuerdo con su estructura, todas poseen un anillo ciclopentano y un número variado de dobles enlaces: así, por ejemplo, encontramos a PGH₂, que posee dos dobles enlaces en su estructura y la letra H que nos indica el grupo funcional (Tsai y Kulmaz, 2010). Los eicosanoides no pueden ser almacenados, son producidos *in vivo* por la célula en respuesta a una perturbación o estrés (Seguineau *et al.*, 2011). Las PG, a diferencia de las hormonas comunes no viajan en la sangre, sino que actúan en las células vecinas o en la misma célula que la produjo, esto es, tienen un efecto paracrino. En mamíferos, las PG derivadas del ARA, llamadas PG de la serie 2 o PG₂ están involucradas con procesos inflamatorios, dolor y respuesta febril (Wang y DuBois, 2010). En moluscos, la producción de PG ha sido ligada en la defensa química, el mantenimiento un balance iónico en las branquias (Freas y Grollman, 1981; Saintsing *et al.*, 1983) y la inducción al desove (Osada y Nomura, 1990). En ostiones, se ha reportado que durante un estrés, las PG actúan como hormonas moduladoras del estrés, como es el caso de estrés salino en *C. gigas*, donde además se observó un incremento de ARA junto con el incremento de la salinidad (Fuhrmann *et al.*, 2018), o el estrés térmico, donde Fields *et al.* (2016) reportan un incremento de la enzima 15-hydroxyprostaglandina deshidrogenasa (15-PGDH) la cual es responsable del primer paso de degradación de las PG por oxidación del grupo hidroxil en el carbono 15 para producir PGE₂ en el mejillón *Geukensia demissa* después de haber sido sometido a un choque térmico (de 15°C a 45°C, 1 hora).

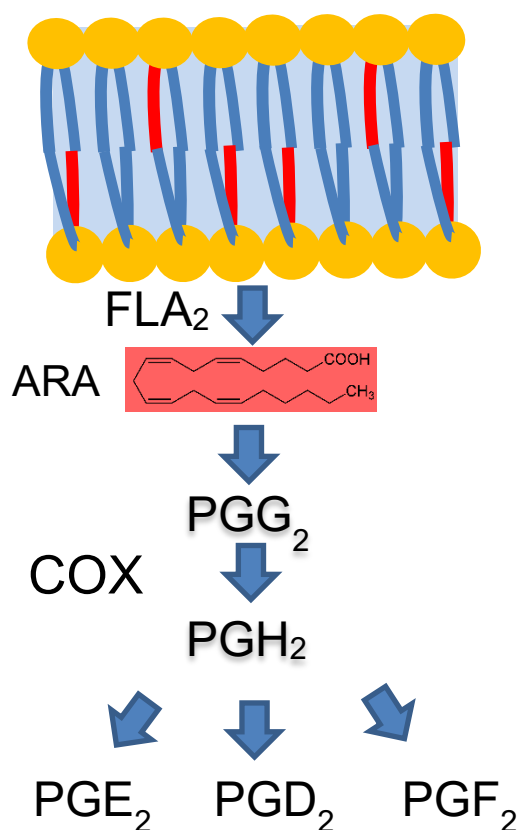


Figura 8. Esquema que muestra la síntesis de prostaglandinas (PG) a partir del ácido araquidónico (ARA) por medio de la ciclooxygenasa (COX).

También existe la producción de lípidos oxidados por la vía no enzimática; al incrementar el metabolismo, aumenta el consumo de reservas energéticas y producción de energía a nivel mitocondrial, por lo que hay un incremento en especies reactivas al oxígeno (ROS). Gran parte de los ROS son neutralizados por las defensas antioxidantes del organismo, pero cuando el metabolismo es alto y prolongado, algunos ROS producen oxidación de moléculas, en especial las presentes en las membranas, tales como los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, por sus siglas en inglés) y los ácidos grasos altamente insaturados (HUFA, por sus siglas en inglés), que son especialmente susceptibles al daño oxidativo por la presencia de dobles enlaces. La oxidación no enzimática de PUFA y HUFA produce isoprostanoides (IsoP) y otras moléculas con actividad biológica similares a las PG, pero con una regulación mucho menos estrecha. A diferencia de la formación de PG por vía de la COX, la cual inicia con el ARA libre, la formación de IsoP se lleva

a cabo *in situ* con la oxidación del ARA esterificado en la membrana celular el cual, posteriormente es liberado por la fosfolipasa (Milne *et al.*, 2015). En la formación de IsoP F₂ inicialmente los ROS reaccionan con el ARA, la molécula es sometida a la abstracción de un átomo de hidrógeno bi-alilílico (hidrógenos enlazados a un carbono que se encuentra flanqueado por 2 dobles enlaces en la cadena de AG) para producir un radical araquidonil centrado en carbono (Fig. 9). Además, hay una inserción de oxígeno (O₂), lo que conduce a la formación de radicales peroxilo. Cuatro diferentes isómeros son formados dependiendo del sitio de abstracción de hidrógeno y el sitio de inserción de oxígeno (Miller *et al.*, 2014).

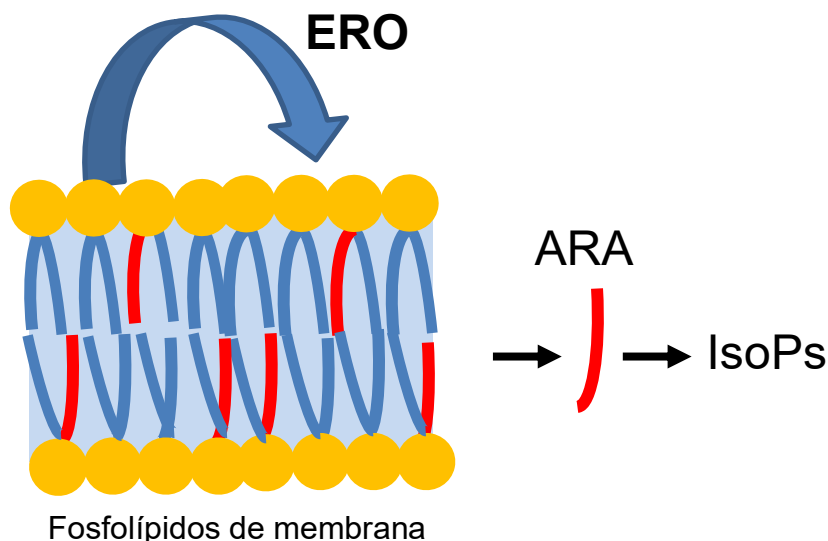


Figura 9. Formación de Isoprostanos (IsoPs) a consecuencia del ataque de las especies reactivas de oxígeno (ROS) sobre los fosfolípidos de membrana.

2.5 Lípidos neutros y lípidos polares

El ARA a partir del cual se sintetizan las PG, se encuentra en los fosfolípidos, específicamente, el fosfatidilinositol contenido en la membrana celular (MC). Los fosfolípidos, también conocidos como lípidos de membrana, lípidos polares (LP) o lípidos estructurales son determinantes en la estructura y función de las membranas celulares (Paoletti y Kritchevsky, 2017). Son moléculas anfipáticas, es decir, con una cabeza hidrofílica y una cola hidrofóbica. La fracción de LP incluye

principalmente fosfolípidos y esfingolípidos (Lordan *et al.*, 2017; Zheng *et al.*, 2019). La mayoría de los LP encontrados en las membranas celulares son los glicerofosfolípidos, los cuales tienen una cadena principal de glicerol al cual se unen un ácido graso saturado en la posición 1 y un ácido graso insaturado en la posición 2, en el tercer hidroxilo un grupo fosfato, al cual se puede unir un grupo adicional dividiéndose en fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, y fosfatidilglicerol (Paoletti y Kritchevsky, 2017; Solovchenko, 2012). El contenido de ácidos grasos en los LP está sujeto a una estricta regulación dentro de la célula pues la composición de ácidos grasos afecta directamente las propiedades físicas y la fluidez de la MC. Además de su importancia como componentes estructurales de las membranas celulares y organelos. Junto con su función estructural, los lípidos polares pueden operar como moléculas señalizadoras o sus precursores: Tal es el caso de los eicosanoides (Solovchenko, 2012).

Por otro lado, los lípidos neutros (LN), también conocidos como lípidos no polares, de reserva, acilglicéridos, o triglicéridos (TG) consisten en ácidos grasos unidos a un glicerol. Son hidrofóbicos y carentes de grupos polares libres (Lordan *et al.*, 2017), por lo que no pueden integrarse a en la bicapa de membrana en cantidades sustanciales (Athenstaedt y Daum, 2006). Los LN son comúnmente almacenados dentro de una monocapa fosfolipídica interdigitada con proteínas claves formando gotas lipídicas citoplasmáticas (Ruggles *et al.*, 2013). Los LN incluyen acilgliceroles (incluye a los mono-, di- y TG), ésteres de cera, ácidos grasos libres, esteroides, ésteres de colesterol, entre otros, siendo los TG el grupo más abundante de compuestos e involucrados en el catabolismo para la producción de energía requerida por la célula (Solovchenko, 2012), por lo que tienen una función de almacenamiento no específico. El almacenamiento de estos los LN permite a la célula sobrevivir a periodos de disminución de nutrientes y a través de su lipólisis provee los bloques de construcción de las membranas, como ácidos grasos o esteroides para la división celular o integridad de la membrana (Ruggles *et al.*, 2013).

En trabajos anteriores, se ha sugerido que el ARA puede ser acumulado en los LN y transferido a LP cuando se requiere para síntesis de PG, probablemente

para regular la síntesis no enzimática de isoprostanoïdes a partir del ARA presente en la MC por medio de ROS. Por ejemplo, Palacios *et al.* (2007) reportó mayor cantidad de ARA en organismos silvestres de pez blanco (*Menidia estor*), en comparación con organismos provenientes de cultivo. También reportó una mayor proporción de ARA en los lípidos neutros de la gónada de macho de pez blanco en comparación con las hembras, donde posiblemente disminuyó para formar PG. Para comprobar lo anterior, una posibilidad es realizar estudios de enriquecimiento de alimento vivo y peletizado con distintas relaciones de ARA durante una situación de estrés. Aguilar *et al.* (2012) realizó un experimento sometiendo a los camarones a diferentes tipos de estrés físico (hacinamiento) y fisicoquímico (deterioro de la calidad de agua) y alimentando a los organismos con dietas suplementadas con dos niveles de ARA, una dieta alta (3.2%) y una dieta baja (0.8%) como alternativa para disminuir los efectos negativos del estrés y observó una mayor proporción de ARA en lípidos de reserva en comparación con los fosfolípidos en los hemocitos de los camarones alimentados con la dieta ARA alto, y sugiere que podría deberse a que los acilglicéridos podrían fungir como un reservorio de ARA para que este ácido graso sea transferido a los fosfolípidos si se requiere para mantener su función en las membranas, tal como la síntesis de eicosanoides.

Salgado (2009) realizó un experimento con pez blanco cultivado suplementando la alimentación de los reproductores con *Artemia* enriquecida con tres niveles distintos de ARA, 3% como control, 4% y 7%. Encontraron mayores niveles de ARA en los LN, mientras que los niveles de ARA en los fosfolípidos no fueron afectados por la dieta.

Hurtado *et al.* (2009) realizó un experimento con adultos de *C. corteziensis* suplementando una dieta mono-algal (*Isochrysis galbana*) con emulsiones lipídicas con 3 niveles de ARA, 0%, 1% y 9%. No encontró diferencias significativas en la concentración de ARA en los lípidos polares de los tejidos de ostión mientras que la concentración de ARA en los lípidos neutros aumentó conforme los niveles de ARA en la dieta, al igual que los niveles de la PGE₂, sugiriendo que es posible que las

PG se sinteticen a partir del ARA de los LN, manteniendo con ello constantes los niveles de ARA de lípidos estructurales.

2.6 Isótopos Estables

Para probar lo anterior, se propone evaluar si existe una transferencia de ARA entre LN y LP durante un estrés. Un enfoque posible es la utilización de isótopos estables. Los isótopos son átomos de un mismo elemento químico que poseen el mismo número de protones, pero que difieren en su número de neutrones y, por lo tanto; tienen diferente masa atómica. Los elementos químicos en ácidos grasos son: carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O) y sus respectivos isótopos más abundantes son el ^{12}C , ^1H , ^{16}O . Sin embargo; existen otros isótopos de estos elementos que son menos abundantes en la naturaleza, como el ^{13}C , ^2H y ^{18}O . Cuando uno de estos isótopos naturalmente menos abundante es sustituido por su isótopo más abundante, entonces se habla de un marcaje y se crea un trazador. El enriquecimiento o marcaje de muestras biológicas puede ser medido por diferentes técnicas como la Resonancia Magnética Nuclear (NMR, por sus siglas en inglés) o por espectrometría de masas (MS), éste último a menudo interconectado con un instrumento en el cual primero se separa la molécula de interés, por ejemplo; cromatografía de gas (GC) o cromatografía líquida (LC), entre otros. En GCMS y LCMS la molécula marcada, por ejemplo, ^{13}C (el trazador), se mide en relación con la molécula presente de forma natural, es decir no marcado. Una de las principales ventajas de los isótopos estables sobre los isótopos radiactivos es que tanto la molécula marcada y la encontrada de forma natural se pueden medir simultáneamente con una precisión muy alta. El espectrómetro de masas de relación isotópica (IRMS) mide el enriquecimiento isotópico de un gas, por lo tanto, cuando se inyectan muestras líquidas estas son transformadas a gas en por medio de un sistema de combustión, en necesario tener un alto rendimiento en el proceso de combustión para asegurarse de que todas las moléculas sean quemadas, es una técnica muy sensitiva y, por lo tanto, puede ser usada cuando el enriquecimiento es bajo. Las muestras son convertidas a gases mediante combustión o pirolisis, que

luego se separan. En el caso particular del ^{13}C , este es convertido a CO_2 . El uso de isótopos estables en metabolismo de lípidos se encuentra ampliamente descrito en la literatura en el área médica donde se administra una molécula de interés con átomos marcados ya sea de forma oral o intravenosa (Schienbeek *et al.*, 2012).

En el presente trabajo, se pretende usar isotopos estables de ARA para observar si hay una acumulación de ARA proveniente de la dieta en los triglicéridos, y evaluar si existe una transferencia desde los triglicéridos hacia los fosfolípidos ante un estrés térmico, que pueda contribuir a la formación de PG.

2.7 Pregunta de investigación

¿Existe transferencia de ARA desde triglicéridos hacia fosfolípidos ante un estrés térmico relacionada con la producción de PG en semilla de ostión?

3. JUSTIFICACIÓN

El ostión es un recurso que además de servir como alimento y ser fuente de nutrientes esenciales para los humanos, tiene un importante papel en la economía nacional mexicana, ya que ocupa el décimo lugar mundial en cuanto a su producción en toneladas representa un mercado de 50 mil toneladas anuales. Sin embargo, desde 1997 se han reportado episodios de mortalidades, lo que se traduce en grandes pérdidas para los productores.

En el presente trabajo se pretende determinar cómo los incrementos de temperatura modulan la mortalidad de semilla de ostión, lo cual podría tener aplicaciones prácticas en el cultivo durante el verano en particular en países tropicales o sub-tropicales, así como en relación al incremento de temperatura ante un cambio climático. Con los resultados del presente estudio, se pretende determinar si al cambiar parámetros durante el cultivo como, por ejemplo, ofrecer una dieta rica en ARA para incrementar la producción de PG, puede afectar la respuesta fisiológica al estrés térmico y la supervivencia de los ostiones. Además, se pretende contribuir a la ciencia básica al establecer los mecanismos fisiológicos que se disparan ante un incremento de temperatura en semillas de ostión.

4. HIPÓTESIS

El estrés térmico promueve una producción de PG a partir de ARA de fosfolípidos, tanto de forma enzimática por medio de COX, como no enzimática por ROS. En organismos que acumulen el ARA en triglicéridos y lo vayan transfiriendo a fosfolípidos a medida que se requiera durante un estrés térmico, habrá menor producción PG dado que no se producirán por oxidación, mientras que en organismos que acumulen el ARA en fosfolípidos habrá mayor producción de prostaglandinas y una mayor respuesta fisiológica al estrés en ostiones.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar el efecto de un estrés térmico sobre procesos fisiológicos de semilla de ostión (*Crassostrea gigas*) y la producción de prostaglandinas.

5.2 Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto de un estrés térmico sobre la supervivencia e ingestión de alimento de semillas de ostión *Crassostrea gigas*.
2. Evaluar el efecto de un estrés térmico sobre los parámetros de respuesta: PG, HSP, conteo de hemocitos, altura del epitelio de la glándula digestiva y respuesta enzimática antioxidante, en semillas de ostión *C. gigas*.
3. Evaluar la movilización de ARA entre lípidos neutros y polares ante un estrés térmico en semillas de ostión *C. gigas* usando una dieta enriquecida con isótopos estables de ARA.
4. Evaluar el efecto de un estrés térmico en semillas de ostión *C. gigas* sometidos a una dieta enriquecida con isótopos estables de ARA.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Experimento.

6.1.1 Sistema experimental

El experimento se llevó a cabo dentro de una cámara experimental del Laboratorio de Ecofisiología de Organismos Acuáticos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). El sistema experimental consistió en 6 tinajas de fibra de vidrio con capacidad de 370 L en las cuales con ayuda de seis bombas de calor se controló la temperatura del agua marina de acuerdo con una programación preestablecida (Fig. 10). Las tinajas fueron llenadas a una tercera parte de su capacidad con agua marina. El agua marina fue filtrada con un filtro de tipo bolsa con luz de malla de 1 μm . Las unidades experimentales consistieron en vasos de precipitados (Pyrex®) con capacidad de 1 L los cuales se colocaron dentro de cada tina y fueron llenados con agua marina al 100% de su capacidad. El sistema de aireación utilizado fue por burbujeo utilizando mangueras de látex por las cuales circulaba el aire, ésta se pinchó con el extremo punzante de agujas hipodérmicas las cuales estaban conectadas a tubos hueco de plástico que se encontraban sumergidos en las unidades experimentales y por las cuales se hacía pasar el aire.

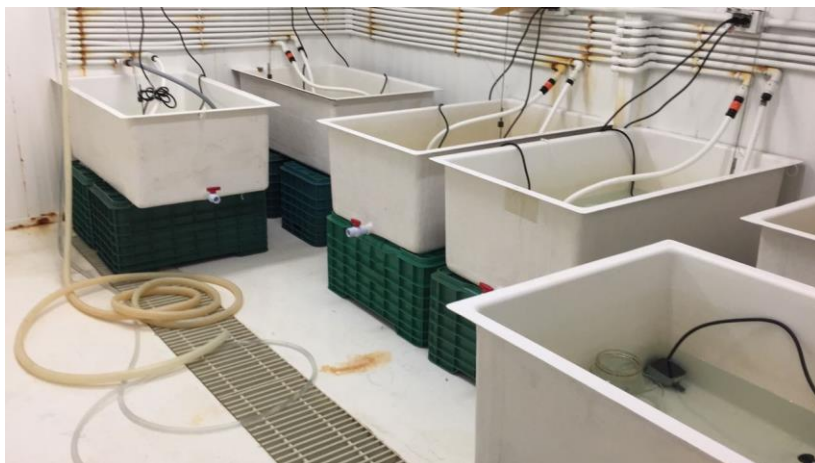


Figura 10. Sistema experimental, Laboratorio de Fisiología de Organismos Acuáticos, CIBNOR.

6.1.2 Diseño experimental

Seis tanques de fibra de vidrio fueron requeridos para este experimento, en tres se aplicó una rampa de temperatura con un incremento de 15°C diariamente (de 20°C a 35°C) y los otros permanecieron a una temperatura constante (20°C) durante todo el experimento, y fueron empleados como tratamiento control (Fig. 11). Con el fin de evaluar si la forma química del ARA (esterificado o forma libre) influía en acumulación y transferencia de ARA de LN a LP, de forma simultánea se añadió una unidad experimental más a cada tanque dentro de la cual se colocaron 100 semillas de ostión/L y se alimentaron con la microalga *Chaetoceros calcitrans* (40,000 cel/ml) y además se suministró una ARA ¹³C (No. ítem 17336) a una concentración de 16ug/ml.

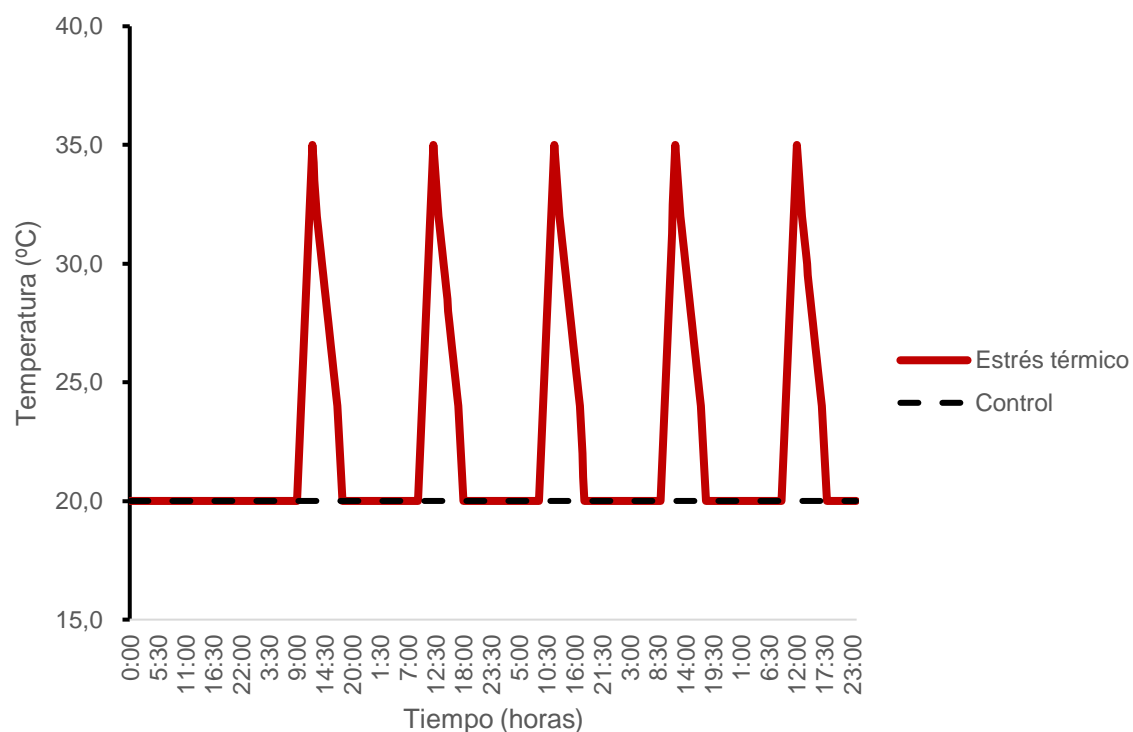


Figura 11. Rampa de temperatura con un aumento de 3°C/hora, de 20°C a 35°C diseñada para las tinas sometidas a un estrés térmico. CIBNOR SC, LEOA, realizó: MC GGS, MC RIVS.

Las semillas de ostión *C. gigas* de 30 días (Fig. 12) fueron donadas por el Laboratorio de Genética Acuícola del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). Las semillas fueron secadas con ayuda de papel absorbente y contadas hasta obtener 100 semillas de ostión. Un total de 100 semillas de ostión fueron pesadas en una balanza analítica (Mettler Toledo, 0.0001g) obteniendo un peso húmedo de 0.3676 g. Tomando este valor como base, a partir de entonces se pesaron 0.3676 g de semilla de ostión por unidad experimental (6 vasos de 1 L en cada tanque) y se distribuyeron aleatoriamente dentro de las unidades experimentales, en total 36 unidades.



Figura 12. Semilla de ostión *Crassostrea gigas* utilizadas en el experimento.

6.1.3 Condiciones de cultivo

Se realizaron recambios de agua del 100% diariamente con agua marina filtrada con un filtro de bolsa con luz de malla de 1 μm . El agua de recambio se colocó en frascos de vidrio con capacidad de 2 L dentro de las tinas con incremento de temperatura y dentro de las tinas a temperatura constante, respectivamente, esto con el fin de mantener el agua de recambio exactamente a la misma temperatura del agua de las unidades experimentales. Los parámetros fisicoquímicos de las unidades experimentales fueron tomados diariamente con la ayuda de un medidor multiparámetro (YSI Inc.). Las semillas de ostión se alimentaron con un concentrado de células de la diatomea *Chaetoceros muelleri* para obtener una densidad celular

de 424,342 cel/ml como única dieta. Se suministró una ración diaria de 3 ml del concentrado de *C. muelleri*-¹³C, lo que corresponde a una densidad de 1,273,027 cel/ml por cada 100 semillas de ostión/L. El experimento tuvo una duración de 4 días.

6.1.4 Producción de microalga marcada

La microalga *C. muelleri* cepa CCMP 1316 fue cultivada mediante un sistema discontinuo (batch) a 20°C por 10 días bajo iluminación continua hasta alcanzar la fase exponencial usando medio f/2, como se describe en Arnold *et al.* (2015). El medio de cultivo fue suplementado con 1 mM de bicarbonato de sodio (¹³C, NaH¹³CO₃, 99%) (Cambridge Isotope Laboratories, MA, USA). Después el cultivo fue transferido a un matraz Erlenmeyer y el sistema de cultivo fue sellado y el medio fue purgado con gas nitrógeno con el fin de eliminar el CO₂ atmosférico. Finalmente, las células fueron enjuagadas tres veces con agua nanopura para eliminar los restos de trazas NaH¹³CO₃.

6.1.5 Evaluación del consumo de microalga durante el experimento

Para evaluar el consumo de *C. muelleri* por las semillas de ostión *C. gigas* se utilizó un contador de partículas Multiziser 3 (Beckman Coulter Counter) como se reporta en Bautista-Romero (2018). Para la toma de muestra se procedió de la siguiente manera: Se añadieron 0.5 ml de Lugol como solución fijadora a un contenedor (Brand™ Coulter Counter Sample Cups) de poliestireno con capacidad de 50 ml y posteriormente se añadió agua del cultivo previamente homogenizada con ayuda de un molidor circular para facilitar la suspensión uniforme de la microalga dentro de las unidades experimentales. Se tomaron muestras por duplicado por unidad experimental y se almacenaron en refrigeración hasta su posterior lectura en el contador de partículas. Se tomaron muestras en tres diferentes tiempos, justo después de alimentar aproximadamente a las 10 de la mañana de cada día (Tiempo 0), a las 3 de la tarde, es decir 5 horas después de alimentar (Tiempo 5) y al siguiente día antes de realizar el recambio de agua de las unidades experimentales (Tiempo 23).

6.1.6 Muestreo

Al final del experimento cada unidad experimental fue destinada para un análisis diferente, la unidad experimental 1 de cada tanque se destinó para el análisis de isótopos estables, la unidad 2, para el análisis de ácidos grasos, las unidades 3 y 4 para expresión de genes, la unidad 5 para análisis de prostaglandinas y la unidad 6 para los análisis histológicos. La toma de muestra se llevó a cabo de la siguiente manera: con la ayuda de un tamiz con luz de maya de 90 μm se vació el contenido de cada unidad experimental, es decir las semillas de ostión, las cuales fueron lavadas con agua marina y posteriormente con agua destilada para eliminar los restos de microalga que pudieran estar adheridos a las conchas de las semillas. Las muestras destinadas para análisis de ácidos grasos e isótopos estables se colocaron en viales con solución Folch (cloroformo: metanol 2:1). Las muestras destinadas para expresión de genes se colocaron dentro de tubos eppendorf con capacidad de 1 ml y se congelaron con nitrógeno líquido al igual de que las destinadas para análisis de prostaglandinas. Las muestras destinadas para análisis histológico se colocaron dentro de tubos Falcon™ con capacidad de 50 ml y se colocaron en diferentes soluciones fijadoras.

6.2 Extracción de lípidos

La extracción de lípidos se realizó basada en el método de Folch (1957), modificado por Palacios *et al.* (2004). Un total de 100 semillas de ostión por muestra fueron colocadas dentro de viales transparentes con capacidad de 8 ml, posteriormente se añadieron 6 ml de Solución Folch (cloroformo: metanol 2:1) y se almacenaron en el congelador a -20°C durante 24 horas para la extracción de lípidos. Pasado el tiempo de extracción, se añadió a las muestras 10 μl de antioxidante (BHT) y 10 μl de un estándar interno (C23:0). Posteriormente se procedió con la disgregación de los tejidos de la muestra, proceso que se llevó a cabo introduciendo una varilla de vidrio dentro del vial y realizando movimientos circulares dentro de este con el fin de homogenizar los tejidos. A fin de maximizar

la extracción de los lípidos, las muestras se sonicaron durante 10 minutos en un baño frío, usando un sonicador marca Branson Ultrasonic™.

6.2.1 Separación de lípidos neutros y polares

La separación de la fracción neutra y polar se llevó a cabo usando micro-columnas de sílice. Las muestras, que se encontraban en 6 ml de solución Folch, se tomaron 2 ml de muestra, se evaporaron con nitrógeno gaseoso (N₂) hasta 1 mL aproximadamente, el cual, se colocó dentro de las micro-columnas. La separación de las fracciones neutras y polares se realizó eluyendo en las micro-columnas 10 ml de cloroformo: metanol (98:2) y 15 ml de metanol, respectivamente, como se describe en Palacios *et al.* (2007).

6.2.2 Análisis de ácidos grasos metil-esterificados (FAME)

Una vez separadas la fracción neutra y polar, se realizó la derivatización de las muestras por adición de 1 ml de BF₃-Metanol (Tri-Fluoruro de Boro, Supleco). Posteriormente las muestras fueron calentadas durante a 95°C durante 15 min, posteriormente se añadió 1 ml de hexano. Se lavaron las muestras con agua mili-Q, centrifugando (2000 rpm, 5 min.) con el fin de separar las dos fases (hexano y agua), se eliminó la capa inferior de agua. Se recuperó la fase hexano en viales ámbar (2ml) y se inyectaron las muestras en un Cromatógrafo de Gases con Detector de Ionización a la Flama (GC-FID, por sus siglas en inglés) usando Helio como gas acarreador. Se realizó la identificación de los ácidos grasos usando como estándar interno el ácido graso 23:0, de acuerdo a los tiempos de retención de la muestra.

6.3 Determinación de peso seco de *Chaetoceros muelleri*

Con el fin de determinar el peso seco de la microalga utilizada en este experimento, 5 ml del concentrado de microalga *C. muelleri* marcada con ¹³C fueron tomados y se procedió de la siguiente manera: se utilizaron membranas de fibra de vidrio (Whatman®) (con capacidad de retención de 0.45 µm), las cuales fueron colocadas dentro de una mufla a 400°C durante 24 horas, posteriormente fueron

colocadas dentro de un desecador y fueron pesadas en una balanza analítica hasta obtener un peso constante. Posteriormente 5 ml del concentrado de la microalga *C. muelleri* fueron filtrados haciendo pasar el concentrado de microalga por las membranas de fibra de vidrio y extrayendo el agua con la ayuda de una bomba de vacío. Las membranas fueron secadas al interior de la mufla y colocadas después en el desecador durante 1 hora, pasada la cual se pesaron en la balanza analítica (Mettler Toledo, 0.0001g). La determinación de peso seco se realizó por triplicado y se muestra a en la Tabla IV.

Tabla IV. Determinación de peso seco de la microalga *Chaetoceros muelleri*.

No. de muestra	Peso membrana + muestra (g)	Peso membrana (g)	Peso seco (g)
Muestra 1	0.1282	0.0921	0.0361
Muestra 2	0.1304	0.0936	0.0368
Muestra 3	0.1301	0.0931	0.0370
Peso seco promedio			0.037±0.0005

6.4 Lípidos totales por método gravimétrico

Del extracto lipídico de 6 ml extraído por el Método de Folch se tomaron 2 ml para el análisis de lípidos totales por método gravimétrico se siguió la metodología descrita en Arjona y Palacios (2009). Se filtraron las muestras por micro-columnas rellenas con 1.5 de sílice y se agregaron 5 ml de solución Folch y se evaporaron hasta 0.5 ml. Por otro lado, se prepararon tubos de borosilicato de 10 ml y se colocaron en un horno (Symphony™) de temperatura controlada a 80°C por 24 horas, hasta obtener un peso constante. Posteriormente, los tubos se colocaron en un desecador, se dejaron enfriar por 1 hora y se registró el peso de cada uno de los tubos. Se agregaron 2 ml del extracto lipídico y se evaporó a sequedad con nitrógeno gaseoso. Los tubos se colocaron nuevamente en el horno a temperatura controlada a 30°C por 24 horas, pasadas las cuales los tubos se colocaron en un desecador por 1 hora y finalmente se registró el peso del tubo más los lípidos.

6.5 Análisis de Isótopos Estables

Para el análisis de isótopos estables el total de las fracciones neutras y polares fue requerida. Las muestras fueron evaporadas a sequedad usando el evaporador de solventes (Thermo Scientific™) y derivatizadas con Tri-floruro de Boro-metanol (BF₃) (Supelco) por 15 minutos a 95°C. La extracción de los metil-esteres se realizó con hexano y lavados de agua. El análisis de isótopos estables se realizó con un espectrómetro de masas de relaciones isotópicas (IRMS, por sus siglas en inglés) acoplado con cromatografía de gases vía a interfaz de flujo continuo universal Thermo Scientific™. Las condiciones de CG fueron las siguientes: temperatura 250°C y se usó Helio como gas acarreador. Las muestras se analizaron en el PSO (Pôle Spectrométrie Océan) en la IUEM (Institut Universitaire Européen de la Mer) en Brest, Francia.

6.6 Análisis de PGEM

La unidad experimental número 5 de cada tanque se destinó para el análisis de prostaglandinas, 0.0367 g de semillas de ostión por muestra se colocaron dentro de tubos eppendorf con capacidad de 1 ml y se congelaron en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenaron en un ultracongelador a -80°C para su posterior análisis. El análisis se concentró en la determinación de prostaglandina E usando un kit comercial (Prostaglandin E Metabolite ELISA Kit, Item No. 514531, PGEM), como se describe en Segueineau *et al.* (2011). Se pesaron 150 mg de semilla de ostión colocando las semillas de ostión sobre una placa metálica adherida a una barra de hielo (que evita la descongelación de las muestras), posteriormente con la ayuda de un bisturí, aguja de disección y pinzas se retiró la concha de las semillas de ostión con el fin de conservar solo los tejidos y eliminar las posibles interferencias que la concha pudiera causar en los análisis. Después del desconche de cada muestra de 150 mg se logró recuperar 7 mg de tejido, los cuales se colocaron dentro de un tubo eppendorf con capacidad de 1.5 ml y se almacenaron a -80°C. Posteriormente, se prepararon las siguientes soluciones de acuerdo con las instrucciones del manual:

- Buffer ELISA
- Buffer de lavado
- Buffer de Fosfato
- Buffer de Carbonato

Para preparar el buffer ELISA se diluyó el contenido del vial de buffer concentrado ELISA en 90 ml de agua ultra pura. Asegurándose de enjuagar el vial para remover cualquier sal que pudiera encontrarse precipitada. Para preparar el buffer de lavado se diluyó el total del vial de buffer de lavado concentrado en 2 L de agua ultra pura y se añadió 1 ml de polisorbato. Así mismo, se preparó una solución buffer de fosfato disolviendo el contenido del vial buffer de fosfato en 30 ml de agua ultra pura. Para preparar la solución buffer de carbonato 1 M se disolvió el contenido del vial de carbonato en 25 ml de agua ultra pura.

6.6.1 Preparación de la muestra y purificación (Precipitación con acetona)

- Con el fin de remover proteínas presentes las muestras heterogéneas se añadieron 500 µl de solución Hank a cada muestra y el contenido fue transferido a tubos de ensaye.
- Se homogenizó el tejido con ayuda de un poltrón manteniendo la muestra en frío.
- Se añadieron 500 µl de acetona fría y se incubaron las muestras durante 30 minutos a -20°C.
- Se centrifugaron las muestras durante 10 min a 400 g.
- Se transfirió la fase líquida de las muestras a tubos eppendorf de capacidad de 2 ml teniendo cuidado de no tomar el precipitado.
- Se evaporaron las muestras a sequedad y se re-suspendieron 500 µl de buffer ELISA
- Se almacenaron a -20°C.

6.6.2 Derivatización

- A cada muestra de 50 se añadieron 150 µl de buffer de carbonato.

- Se incubaron las muestras a 37°C durante 18 horas.

6.6.3 Acidificación y extracción con acetato de etilo

- Se sacaron las muestras de la estufa donde se encontraban en incubación y se transfirieron de los tubos de ensaye a tubos Falcon de 50 ml.
- Se ajustó el pH a 4, añadiendo en total 40 ml del buffer de acetato de etilo.
- Se transfirieron las muestras a tubos de borosilicato con capacidad de 10 ml (4 tubos por 1 muestra).
- Se añadió 1 ml de acetato de etilo a cada tubo de borosilicato y se agitó.
- Se centrifugaron las muestras durante 5 min a 3000 g.
- Se recuperó el acetato de etilo (fase superior) de cada muestra en un tubo limpio.
- El procedimiento anterior se realizó por duplicado obteniendo al final por cada muestra aproximadamente 8 ml de extracto de acetato de etilo.
- Del total de 8 ml de muestra en acetato de etilo 2 ml fueron destinados para el análisis de prostaglandinas en combinación con análisis isotópico y fueron transferidos a viales de 2 ml los cuales se evaporaron a sequedad y se re-suspendieron en 1 ml exacto de acetato de etilo. Dichas muestras fueron transportadas en hielo seco para evitar la degradación de las prostaglandinas. Los 6 ml restantes de acetato de etilo se analizaron por medio del kit enzimático Prostaglandin E Metabolite ELISA Kit (Item No. 514531).
- Los 6 ml de acetato de etilo restantes se evaporaron a sequedad en un evaporador de solventes y se re-suspendieron en 250 µl de Buffer ELISA (En vez de 1 ml como lo indica el Kit con el fin de corregir los cálculos).

6.6.4 Preparación de los reactivos específicos para el ensayo.

Se mezcló el trazador 100 dnt PGEM AChE (480-well kit; Item No. 414530) con 6 ml de buffer de ELISA. Se mezcló con la ayuda de un vortex, hasta obtener una mezcla homogénea.

Se mezcló el antisuero 100 dnt PGEM ELISA (96-well kit; Ítem No. 414532) con 6 ml de buffer ELSA. Se mezcló con la ayuda de un vortex, hasta obtener una mezcla homogénea.

6.6.5 Realización de ensayo

- Se añadieron 50 μ l del buffer ELISA y 50 μ l de buffer PGEM a los pocillos NSB (non-specific binding).
- Se añadieron 50 μ l de buffer PGEM a los pocillos B₀.
- Se añadió el estándar PGEM ELISA.
- Se añadieron 50 μ l de muestra por pocillo (se realizó por triplicado).
- Se añadieron 50 μ l de trazador PGEM AChE a los pocillos NSB, B₀, S y muestras.
- Se añadió el antisuero PGEM ELISA a los pocillos B₀, S y muestras.
- Se incubó la placa por 18 horas a temperatura ambiente.
- Se vaciaron los pocillos y se enjuagaron cinco veces con el buffer de lavado.
- Se añadieron 5 μ l del reactivo de Ellman's (preparado justo antes de usar) a cada pocillo.
- Se añadieron 5 μ l de trazador a los pocillos TA.
- Se cubrió la placa con el papel film y se agitaron con ayuda de un agitador (Digital Orbital Shaker) y en oscuridad durante 90 minutos.
- Se procedió con la lectura de la placa en un lector de microplaca a 415 nanómetros.
- Se realizaron los cálculos.

6.7 Análisis histológicos

La unidad experimental número 6 de cada tanque fue destinada para los análisis histológicos: Cada unidad contenía un total de 100 semillas de ostión *C. gigas* las cuales fueron divididas en 3 grupos de 30 semillas cada uno, un grupo de semillas fue fijado en solución Davidson, los dos grupos de semillas restantes fueron almacenados sin ningún tipo de tinción, de ser necesario, se teñirán usando otras

técnicas histológicas que permitan distinguir estructuras diferentes a las observadas con hematoxilina-eosina, como se describe en Rodríguez Jaramillo *et al.* (2017).

6.7.1 Fijación en Davidson para histología cuantitativa

Las semillas completas fueron fijadas en solución Davidson (12% glicerina, el 22% de formaldehído 37- 40%, 33% de etanol 95°C, 33% de agua de mar filtrada, y 1/9 (v/v) de ácido acético añadido justo antes de su uso) (4°C, 48 hrs). Las secciones fueron deshidratadas en una serie ascendente de etanol (70% a 100%), aclaradas con xileno, y embebidas en parafina. Se realizaron cortes histológicos de 4 µm de espesor en un micrótopo de rotación, montados en portaobjetos de vidrio, teñidos con Hematoxilina de Harris-eosina y montados en resina con cubreobjetos. Las láminas se examinaron en un microscopio compuesto Olympus BX 50 con óptica de campo claro y objetivos de 4x, 10x, 20x, 40x.

Las laminillas fueron observadas al microscopio y documentadas mediante fotografía digital usando el programa Image ProPlus v. La altura del epitelio de los túbulos del estómago fue medida, así como el número de hemocitos, sin distinción entre granulocitos y hemocitos hialinos. Las mediciones fueron realizadas usando un aumento de 40x.

6.8 Análisis de expresión de genes

6.8.1 Extracción de ácido ribonucleico (ARN)

El ARN total fue extraído utilizando el método del tiocianato de guanidina ácido-fenol cloroformo (solución desnaturante AGCP). Todas las soluciones se trataron con DEPC (dietil pirocarbonato) al 0.1% para lograr un entorno libre de ARNasas. Las muestras se mantuvieron en hielo para evitar la degradación del ARN. Se utilizaron 10 semillas de ostión para los análisis. A cada muestra se les agregó 50 µL de solución AGCP y se homogenizó con pistilo por 1 min. Se agregaron 50 µL de acetato de sodio 2M (mezclando por inversión), 500 µL de fenol saturado en agua DEPC (mezclando por inversión) y 150 µL de cloroformo (mezclando por inversión). Se centrifugó a 11000 rpm por 10 min a temperatura

ambiente y se recuperaron aproximadamente 500 μ L de la fase acuosa. El ARN se precipitó con 700 μ L de isopropanol absoluto durante 30 min en refrigeración a -20°C. Para recuperar el ARN, se centrifugó nuevamente a 11000 rpm durante 20 min a 4°C, descartando el sobrenadante. Se realizó una segunda extracción, resuspendiendo el material comprimido de ARN (pellet) en 500 μ L de solución AGCP. Posteriormente, se realizaron dos lavados por inversión del precipitado de ARN con 500 μ L de etanol al 75% en frío, centrifugando a 11000 rpm durante 20 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet se dejó secar a temperatura ambiente; finalmente, se resuspendió en 20 μ L de agua DEPC para la posterior cuantificación del ARN.

6.8.2 Cuantificación y análisis de integridad del ácido ribonucleico (ARN)

Se determinó la cantidad y calidad del ARN extraído, para ello las muestras se midieron en un espectrofotómetro (NanoDrop ND-2000®, Thermo Scientific) utilizando el coeficiente de la relación de las lecturas de la absorbancia de 260 y 280 nm, considerando como ARN de buena calidad aquellas muestras con un coeficiente entre 1.8 a 2.0, lo que significa que el ARN no está contaminado; el factor de conversión utilizado fue de 40 μ g/ml

La integridad y la pureza del ARN extraído se analizó a través de electroforesis en gel de agarosa/Synergel® al 1% en buffer TBE-DEPC (Tris, Ácido bórico, EDTA). Para probar la ausencia de ADN genómico se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando 1 μ L de muestra (50 ng de ARN) como templado en una reacción con oligonucleótidos específicos (Gapdh o β -actina). Como control positivo se utilizó ADN de *A. crockeri* y agua como control negativo. Los productos de la amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa/Synergel® al 1% en buffer TBE 1X. Cada electroforesis se desarrolló en cámaras horizontales (Biorad) a 80V por 40 min. Los geles se documentaron con un fotodocumentador (Chemidoc®, Biorad).

6.8.3 Diseño de oligonucleótidos

Para llevar a cabo la amplificación de los genes fue necesario diseñar oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes blanco (Tabla V). Estos fueron diseñados a partir del alineamiento de secuencias homólogas depositadas en GenBank (NCBI).

Tabla V. Oligonucleótidos diseñados a partir de secuencias homólogas reportadas en GenBank (NCBI).

Nombre		Secuencia 5'-3'	Tamaño amplicón (pb*)	Gen	Tipo de gen
GST	Fw	GACCCCAGATGACCCTTACCG	71	Glutación S-Transferasa	Proteína de estrés
	Rv	CAAACCCCAAAAGAATGCCCTGT			
Gs	Fw	GAAGAACTCACACATCACCAGC	153	Glutamina sintetasa	Proteína de estrés
	Rv	CACTCCACAAGCAATCGTCCG			
SOD	Fw	GACAAAATGATTGACTTGGCCCGG	144	Superóxido dismutasa	Defensa antioxidante
	Rv	CACTCCACAAGCAATCGTCCG			
COI	Fw	GTGTATGTCCTTATTCTTCCAGG	182	Citocromo oxidasa I	Cadena respiratoria
	Rv	GCACGCGTATCAATATCCATTC			
HSP70	Fw	CTTGCCAGAATTAGAGTGTTAACC	120	Proteína de choque térmico 70 (HSP70)	Proteínas de estrés térmico
	Rv	GGCCAATGTTTCATGTCGTCGGATTG			
ATPs	Fw	CAAACCCCAAAAGAATGCCCTGT	75	ATP sintetasa	Cadena respiratoria
	Rv	GAAGAACTCACACATCACCAGC			
28S	Fw	GGAGTCGGGTTGTTTGAGAATGC	114	Subunidad ribosomal 28S	Proteína ribosomal
	Rv	GTTCTTTCAACTTCCCTCACGG			

Notas: *pb= pares de bases

El análisis de alineamiento para seleccionar las regiones homólogas se realizó mediante el programa MEGA7[®]. Una vez alineadas, las secuencias fueron ensambladas generando un contig mediante el programa DNA Baser[®]. A partir del contig se diseñaron los oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes de interés utilizando la herramienta informática Primer3 (v.0.4.0) (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Las condiciones que se establecieron en Primer3 para el diseño de los oligonucleótidos fueron un tamaño de 18-21 pb; una temperatura de alineamiento de 55-60°C; y un porcentaje de guaninas-citocinas (%GC) de 55%. Las características de cada uno de los oligonucleótidos (número de bases, el tamaño del producto de amplificación, temperatura de alineamiento o T_m y el porcentaje de guaninas-citocinas) fueron corroboradas por el programa OlygoAnalyzer 3.1 (www.idtdna.com/calc/analyzer).

6.8.4 Síntesis de ADN de doble cadena complementario (ADNc)

Se realizó una transcripción inversa a partir del ARN total para obtener el ADN de doble cadena complementario (ADNc). Para ello, en un tubo eppendorf de 0.5 mL, se colocaron 4 µL de Buffer Improm-II 5x (A3803, Promega), 5 µL de agua destilada estéril, 2.5 µL de MgCl₂ (25mM), 1 µL de dNTPs (10mM), 0.5 µL de RNAsin a, 1 µL de oligo-dT18 (10mM), 1 µL de Improm-II RT (Promega) y finalmente 1 µL de ARN (1 ug) en un volumen final de 5 µL. La reacción se colocó en el termociclador (Biorad T100[®] Thermal Cycler) 5 min a 25°C, 60 min a 42°C y 15 min a 72°C. Posteriormente, la reacción se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.8.5 Amplificación de genes mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las moléculas de ADNc de cada gen se amplificaron mediante PCR de punto final. Para la amplificación de las regiones específicas de los genes enlistados anteriormente (Tabla V), se utilizó como templado el ADNc sintetizado a partir del ARN de *C. gigas*, así como ADN extraído de la misma especie. La reacción de PCR fue llevada a cabo en un volumen final de 12.5 uL conteniendo 1-2 uL de ADNc (50 ng/uL), 1 µL de cada uno de los oligonucleótidos (forward y reverse), 6.25 uL de

GoTaq[®] polimerasa 2x (Promega) y 3.25 uL de agua estéril Milli-Q[®]. La PCR fue llevada a cabo de acuerdo al siguiente programa en el termociclador: 95°C 5 min (1 ciclo); 35 ciclos de 94°C 1 min, 45-55°C 1 min y 72°C 1 min; con una extensión final de 72°C 10 min y 4°C infinito. La amplificación de los genes blanco por PCR se han optimizado empleando gradientes de temperatura (45°C–55°C). Los amplicones obtenidos se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa/Synergel[®] al 1% en buffer TBE 1X. En cada pozo del gel se cargaron 5-6 µL de cada producto y 1 µL de Uview[®], además se colocó en cada gel un carril con marcador de 1 Kb (Invitrogen). Cada electroforesis se desarrolló en cámaras horizontales (Biorad) a 80V por 40 min. Los geles se documentaron con un fotodocumentador (Chemidoc[®], Biorad). Los productos obtenidos fueron enviados a secuenciar a la empresa MacroGen (www.macrogene.com).

6.8.6 Análisis de la expresión de los genes de respuesta

Posteriormente, se llevará a cabo la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR). La técnica qPCR presenta la ventaja de amplificar y cuantificar al mismo tiempo las moléculas de ADNc, para lograrlo se utilizan fluoróforos capaces de unirse a las secuencias de interés. Los fluoróforos son marcadores que emiten una señal fluorescente, la cual es detectada y procesada en tiempo real. La señal será proporcional a la cantidad de ADNc presente (Arya *et al.*, 2005). A partir de esta técnica, se obtendrán datos precisos sobre la expresión génica en el tejido de estudio.

6.8.7 Normalización -2 $\Delta\Delta CT$

El método de análisis de datos -2 $\Delta\Delta CT$ (Livak y Schmittgen, 2001) será utilizado para obtener la magnitud de los cambios en los niveles de expresión de los genes de interés en comparación con los genes de referencia. Los cálculos se basan en la comparación de los valores CT (ciclo umbral), tomando en cuenta que la eficiencia de la reacción de la RT-PCR es óptima (100%) tanto en el gen de estudio como en el gen de referencia. El método -2 $\Delta\Delta CT$ expresa la relación entre

los valores CT de la muestra y del control. Una vez cuantificados los transcritos, se realizarán los análisis estadísticos correspondientes.

6.9 Análisis estadístico

Se verificó la distribución normal y homogeneidad de los datos. Se realizó una prueba *t* de Student comparando las medias de dos grupos independientes. Se utilizó una significancia estadística de $P \leq 0.05$ en todos los casos.

7. RESULTADOS

7.1 Experimento: Microalga marcada con ^{13}C .

7.1.1 Supervivencia y consumo de microalga *C. muelleri*

No se presentó mortalidad durante el experimento, por lo tanto, el porcentaje de supervivencia fue del 100%. No se encontraron diferencias significativas en el consumo total de la microalga *C. muelleri* entre los organismos control y aquellos que fueron sometidos a estrés térmico (Fig. 13). Por otro lado, si se encontraron diferencias en el consumo diario de microalga entre las semillas de ostión controles que permanecieron a 20°C y los ostiones sometidos a estrés térmico. El día uno los ostiones que no fueron sometidos a estrés térmico presentaron un mayor consumo (Fig. 14A), mientras que el día dos y tres, los organismos sometidos a estrés térmico presentaron un consumo significativamente mayor ($P \leq 0.05$) a los organismos del tratamiento control (Fig 14B y C), finalmente el día 4 hubo una disminución del consumo por parte los organismos de ambos tratamientos, pero presentando un consumo significativamente mayor los organismos del tratamiento control (Fig. 14D). De forma interesante, el consumo al día 4 regresó a los mismos niveles que al día 1 para el control y estrés térmico.

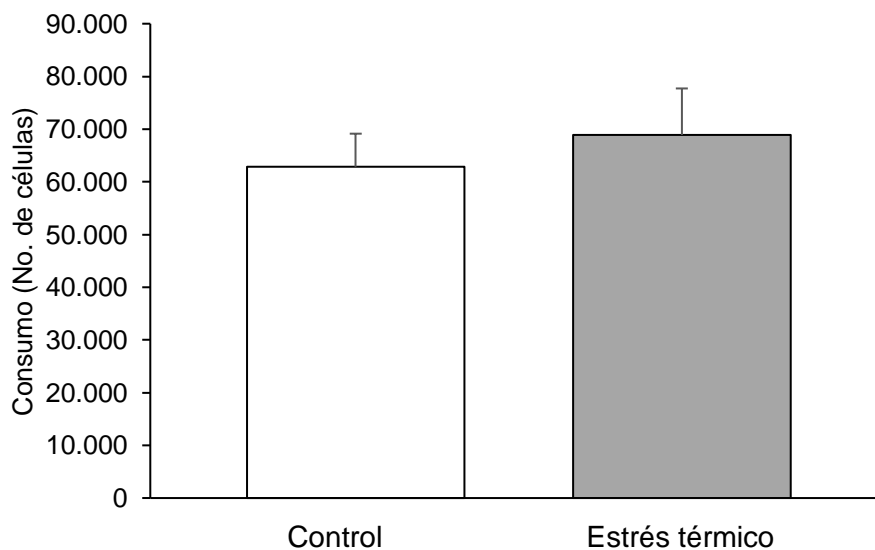


Figura 13. Consumo total de microalga *Chaetoceros muelleri* por las semillas de ostión *C. gigas* a temperatura control y sometidas a un estrés térmico.

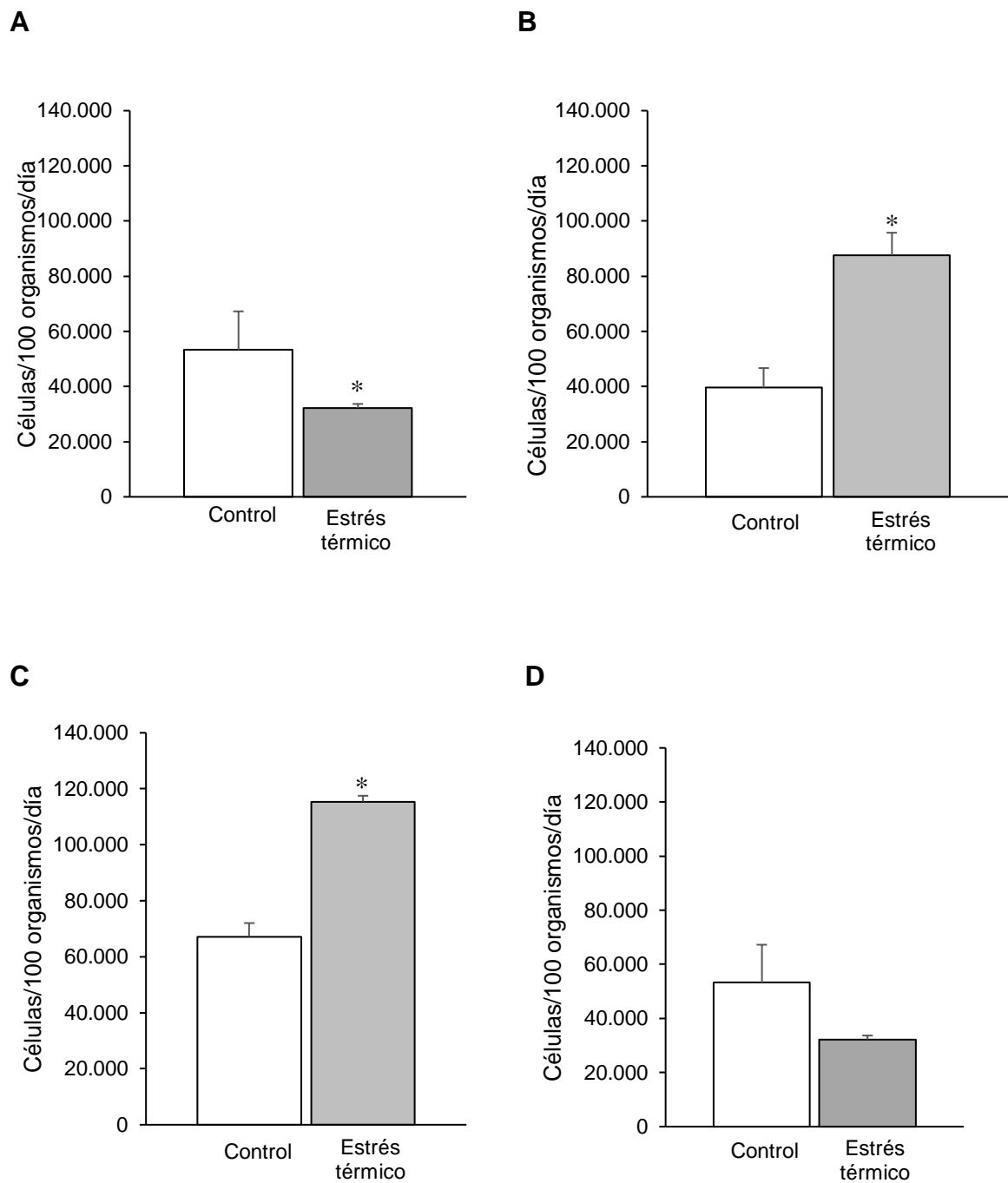


Figura 14. Consumo de la microalga *C. muelleri* por 100 semillas de ostión para el día 1(A), 2(B), 3(C) y 4(D) a temperatura control y sometidas a un estrés térmico.

7.1.2 Composición de microalga

En la microalga *Chaetoceros muelleri* se encontró un contenido de lípidos neutros significativamente mayor ($P \leq 0.05$) expresado en porcentaje (18% del peso total) en comparación con los lípidos polares (2.5%), medidos por el método gravimétrico (Fig. 15).

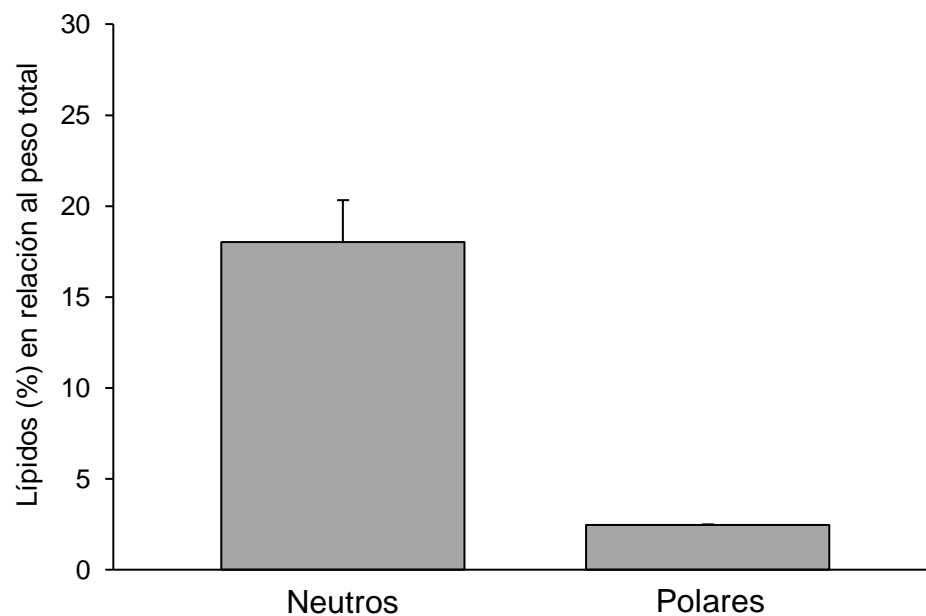


Figura 15. Porcentaje de lípidos neutros y polares (%) en relación al peso total de *C. muelleri* determinado por método gravimétrico.

Los ácidos grasos 16:0, 16:1n-7 y 20:5n-3 fueron los que se presentaron en mayor proporción en ambas fracciones, neutra y polar de la microalga *C. muelleri* (Tabla VI).

Tabla VI. Proporción (% relativos entre AG) de ácidos grasos en la fracción neutra y polar de la microalga *Chaetoceros muelleri*.

Ácido graso	Fracción neutra	Fracción Polar
12:0	0.1 ± 0.00	0.1 ± 0.03
13:0	0.7 ± 0.02	0.1 ± 0.04
14:0	12.4 ± 0.04	11.9 ± 1.81
15:0	0.6 ± 0.01	0.7 ± 0.05
16:0	18.1 ± 0.22	22.1 ± 0.93
17:0	0.1 ± 0.01	0.3 ± 0.05
18:0	1.2 ± 0.02	4.8 ± 1.05
20:0	0.1 ± 0.00	0.3 ± 0.03
22:0	0.3 ± 0.02	1.2 ± 0.17
24:0	0.4 ± 0.02	0.9 ± 0.05
14:1n-8	0.4 ± 0.02	0.1 ± 0.01
15:1n-8	0.2 ± 0.01	0.1 ± 0.01
16:1n-9	1.2 ± 0.10	0.3 ± 0.02
16:1n-7	31.5 ± 0.20	15.8 ± 0.75
18:1n-9	0.9 ± 0.01	3.2 ± 0.79
18:1n-7	1.0 ± 0.02	3.8 ± 0.22
18:1n-5	0.0 ± 0.00	0.3 ± 0.12
22:1n-9	0.1 ± 0.02	1.3 ± 0.67
24:1n-9	0.03 ± 0.01	0.4 ± 0.15
18:2n-6	0.1 ± 0.00	1.9 ± 0.16
18:3n-6	2.6 ± 0.04	4.5 ± 0.35
18:3n-3	0.3 ± 0.00	0.7 ± 0.01
18:4n-3	0.8 ± 0.00	0.8 ± 0.01
20:3n-3	0.1 ± 0.06	3.7 ± 1.91
20:4n-6	7.0 ± 0.05	7.5 ± 0.46
20:5n-3	16.3 ± 0.16	7.0 ± 0.14
21:4n-6	0.2 ± 0.01	0.1 ± 0.02
22:4n-6	0.3 ± 0.01	0.4 ± 0.05
22:6n-3	3.0 ± 0.07	4.0 ± 0.27
SAT.	33.9 ± 0.24	42.5 ± 1.61
MUFA	35.3 ± 0.11	27.0 ± 0.84
PUFA	30.8 ± 0.35	30.6 ± 2.40
HUFA	27.7 ± 0.27	19.8 ± 0.69
(n-3)/(n-6)	1.8 ± 0.01	1.1 ± 0.12
22:6/20:5	0.2 ± 0.00	0.57 ± 0.05
Sat index	177.6 ± 1.50	151.6 ± 7.36
20:4/20:5	0.4 ± 0.00	1.1 ± 0.08

Resultados expresados en medias ± E.E. Medias con un valor de P menor a 0.05 son estadísticamente diferentes.

7.1.3 Análisis histológico

Para determinar la existencia y/o nivel de daño en algunos órganos de *C. gigas* expuesto a estrés térmico, se realizaron análisis histológicos de la glándula digestiva y conteo de hemocitos al final del experimento (día 4). En la Fig. 16A se muestra la glándula digestiva de una semilla de ostión que permaneció a temperatura constante (20°C, Control) donde se puede observar la forma normal estrellada del lumen de la glándula, anatomía normal de la glándula sin daño en el epitelio. Por otro lado, en la Fig. 16B se identificó daño en la glándula digestiva de las semillas de ostión expuestas a estrés térmico, en los cuales se observa adelgazamiento del epitelio presentando una altura de epitelio de la glándula digestiva significativamente menor en comparación con las semillas del tratamiento control (Fig. 17). También se encontraron diferencias significativas en el número de hemocitos por área (mm²) entre el tratamiento estrés térmico y el control, presentando mayor número de hemocitos el tratamiento estrés térmico al día 4 del experimento, como se aprecia en la Fig. 18.

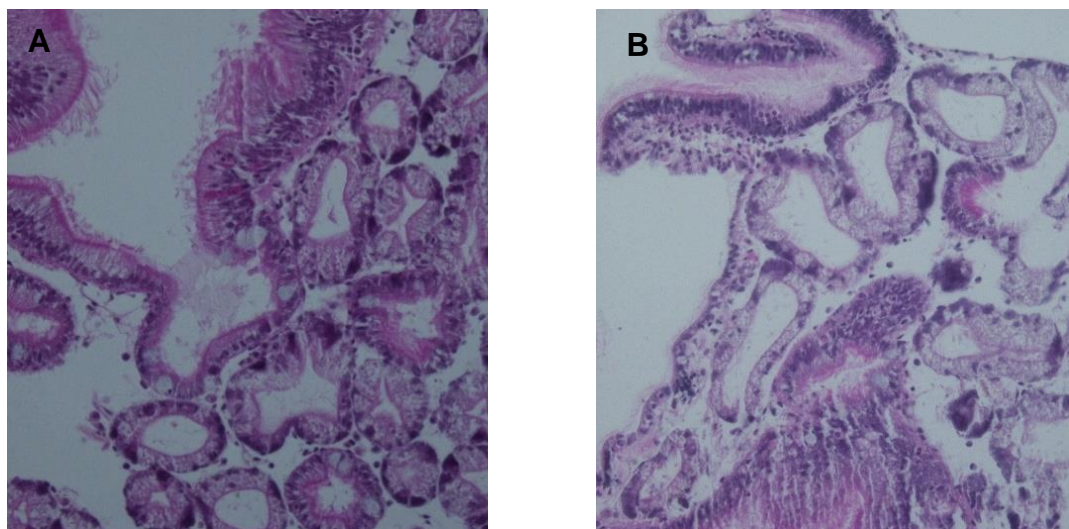


Figura 16. Imágenes digitalizadas de una sección transversal del epitelio de los túbulos de la glándula digestiva en semilla de ostión *C. gigas* a temperatura control (A) y sometidas a estrés térmico (B) (40x, Image Pro).

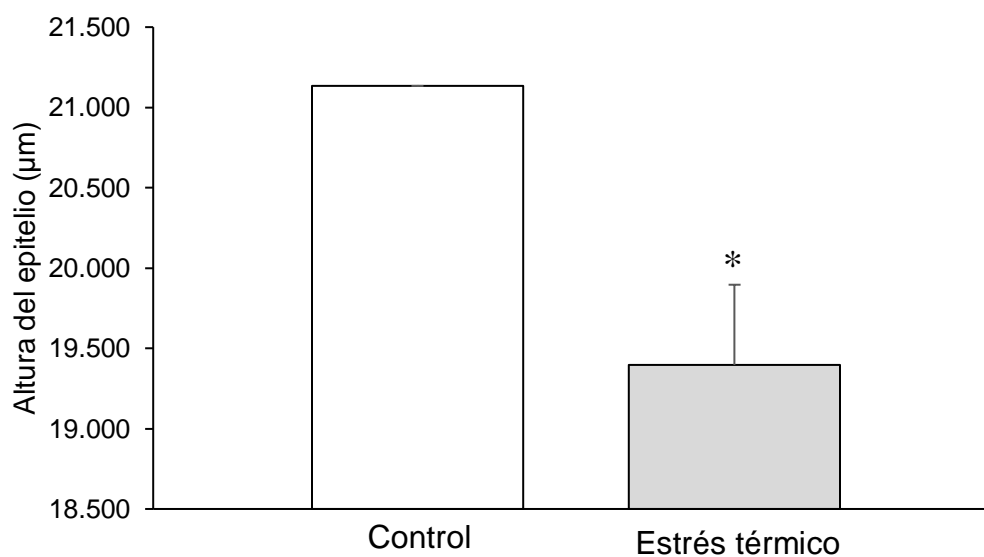


Figura 17. Altura del epitelio de los túbulos de la glándula digestiva de semilla de ostión *C. gigas* a temperatura control y sometidas a estrés térmico. *Indica diferencias significativas ($P \leq 0.05$ *t*-test).

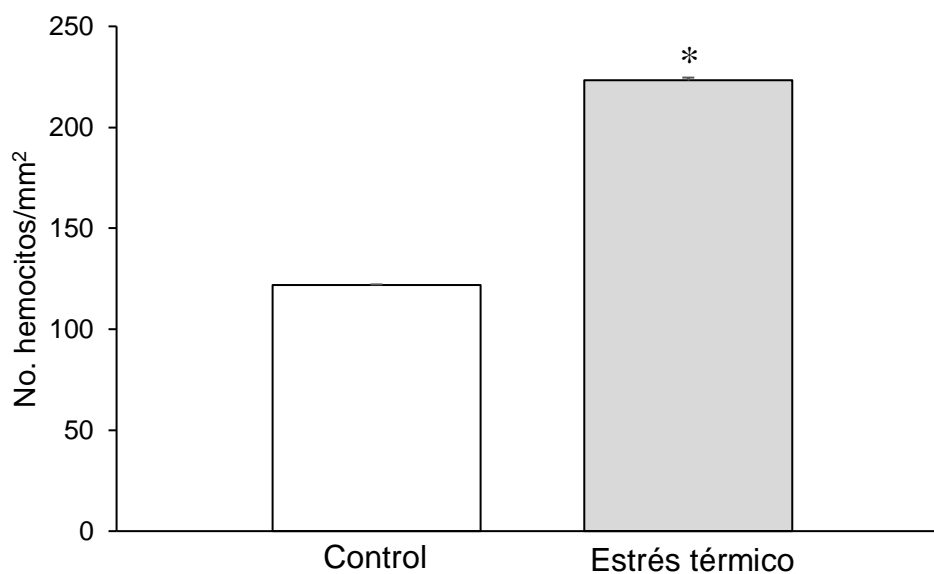


Figura 18. Número de hemocitos/mm² en semilla de ostión *C. gigas* a temperatura control y sometidas a estrés térmico. *Indica diferencias significativas ($P \leq 0.05$ *t*-test).

7.1.4 Expresión de Genes

En las semillas de ostión sometidas a estrés térmico por medio de fluctuaciones diarias de temperatura (20-35°C) se observaron cambios en los niveles de expresión respecto a los organismos control que permanecieron a temperatura constante (20°C). Se observó una respuesta de sobreexpresión en relación a los organismos control en genes relacionados a cadena respiratoria (COI I y ATP sintasa), estrés oxidativo, como la defensa antioxidante (SOD) y detoxificación celular (GST), estrés térmico (HSP70) y osmorregulación (Gs). Estos cambios se observan en la Fig. 19, 20, 21, 22, 23 y 24.

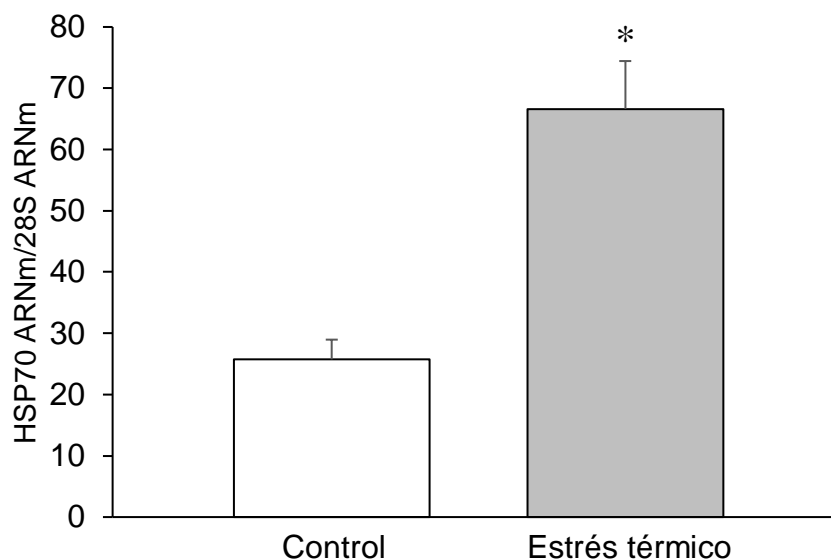


Figura 19. Número de copias de la enzima proteína de choque térmico 70 (HSP70) mRNA por 10,000 copias de 28S mRNA. Las barras representan la media \pm E.E. de tres réplicas independientes (unpaired *t*-test; * $P \leq 0.05$).

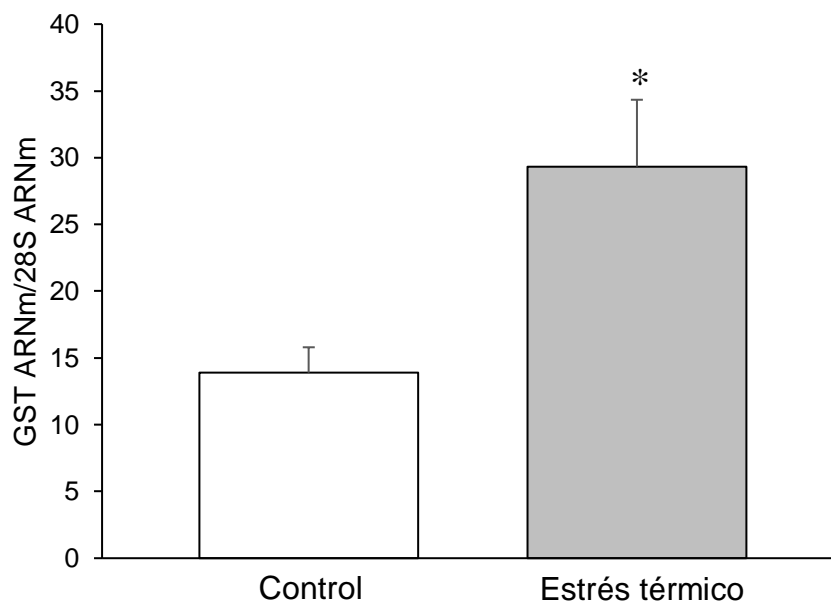


Figura 20. Número de copias de la enzima glutatión S-transferasa (GST) mRNA por 10,000 copias de 28S mRNA. Las barras representan la media \pm E.E. de tres réplicas independientes (unpaired *t*-test; * $P \leq 0.05$).

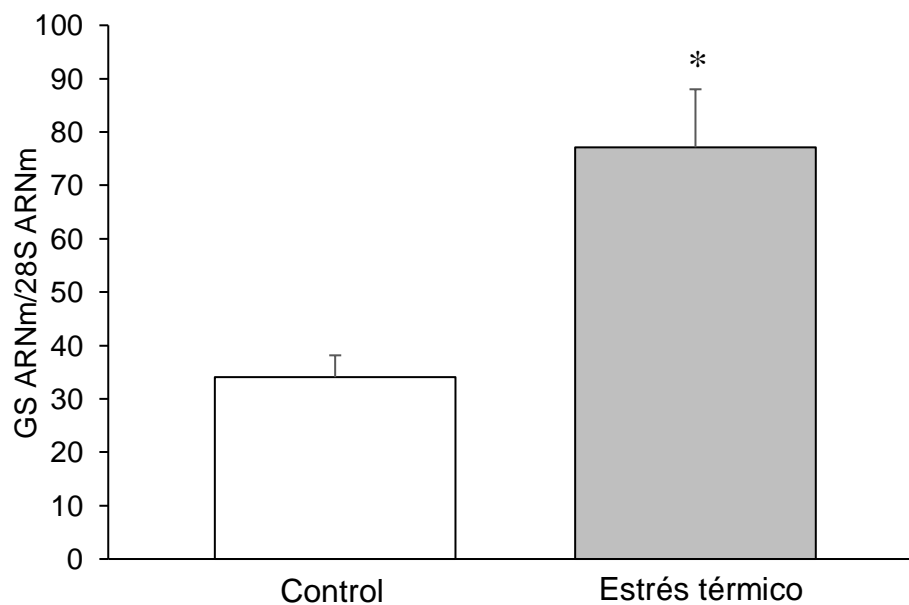


Figura 21. Número de copias de la enzima glutamina sintetasa (GS) mRNA por 10,000 copias de 28S mRNA. Las barras representan la media \pm E.E. de tres réplicas independientes (unpaired *t*-test; * $P \leq 0.05$).

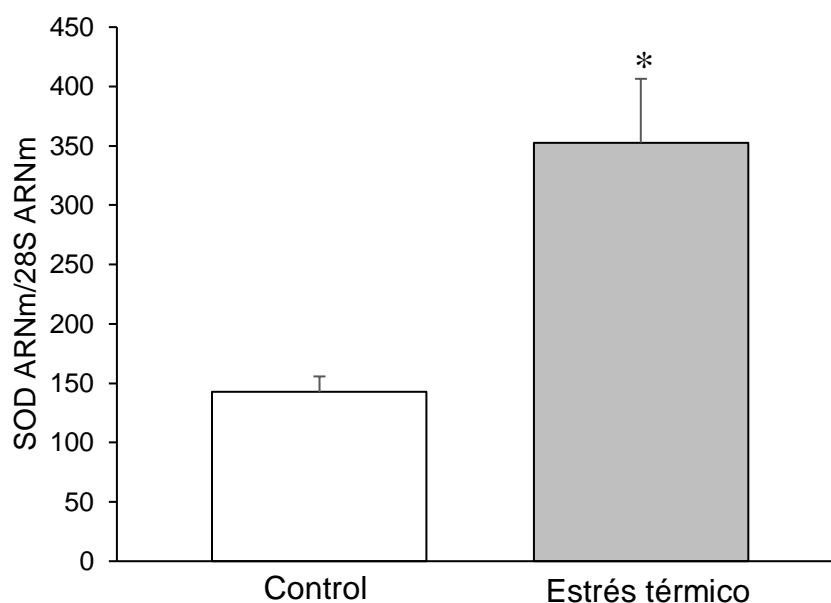


Figura 22. Número de copias de la enzima superóxido dismutasa (SOD) mRNA por 10,000 copias de 28S mRNA. Las barras representan la media \pm E.E. de tres réplicas independientes (unpaired *t*-test, * $P \leq 0.05$).

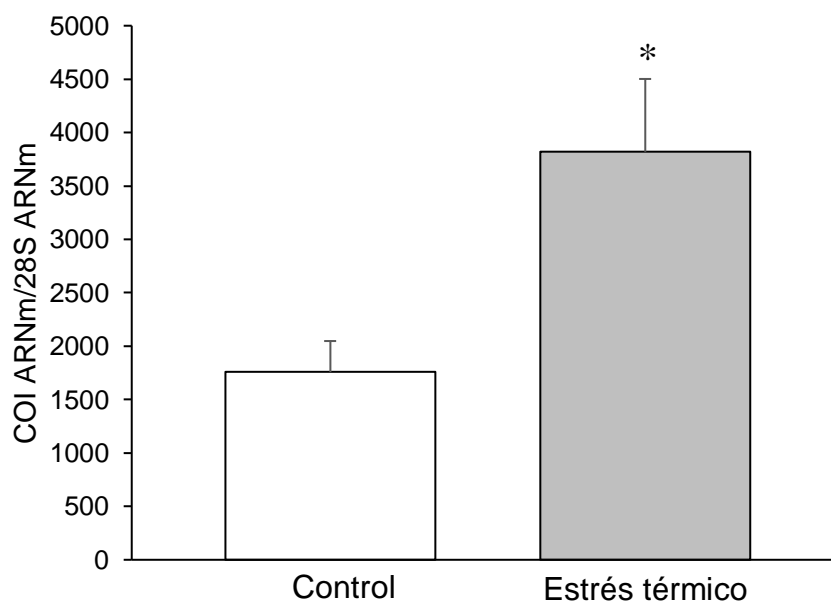


Figura 23. Número de copias de la enzima citocromo oxidasa I (COI) mRNA por 10,000 copias de 28S mRNA. Las barras representan la media \pm E.E. de tres réplicas independientes (unpaired *t*-test, * $P \leq 0.05$).

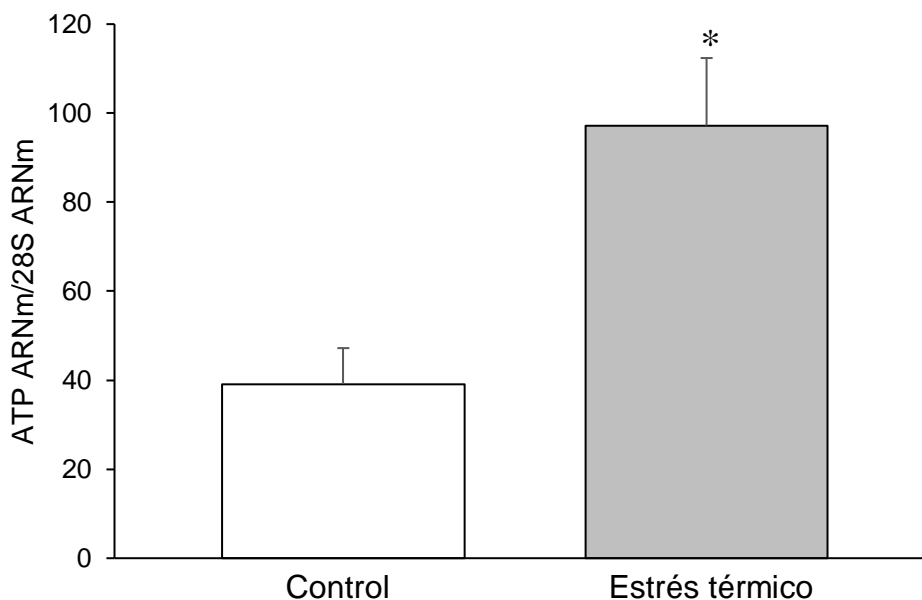


Figura 24. Número de copias de la enzima ATP sintetasa mRNA/10,000 copias de 28S mRNA. Las barras representan la media \pm E.E. de tres réplicas independientes (unpaired *t*-test; * $P \leq 0.05$).

7.1.5 Lípidos

7.1.5.1 Lípidos totales

Se observó un mayor porcentaje de lípidos polares en comparación con la fracción neutra en relación a los lípidos totales de los tejidos completos de semilla de ostión. Se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en el porcentaje de lípidos neutros y polares en relación a los lípidos totales entre tratamientos, presentando un mayor contenido de lípidos neutros del tratamiento control (4.2%) así como un mayor contenido de lípidos polares (24.7%) (Fig. 25 y 26).

7.1.5.2 Ácidos grasos

Se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en la proporción de los ácidos grasos de los LN que se muestran en la Tabla VII y de los LP en la Tabla VIII.



Figura 25. Porcentaje de lípidos neutros en relación al peso seco total del organismo en semillas de ostión a temperatura control y sometidas a estrés térmico determinados por el método gravimétrico (*t-test* $P \leq 0.05$).

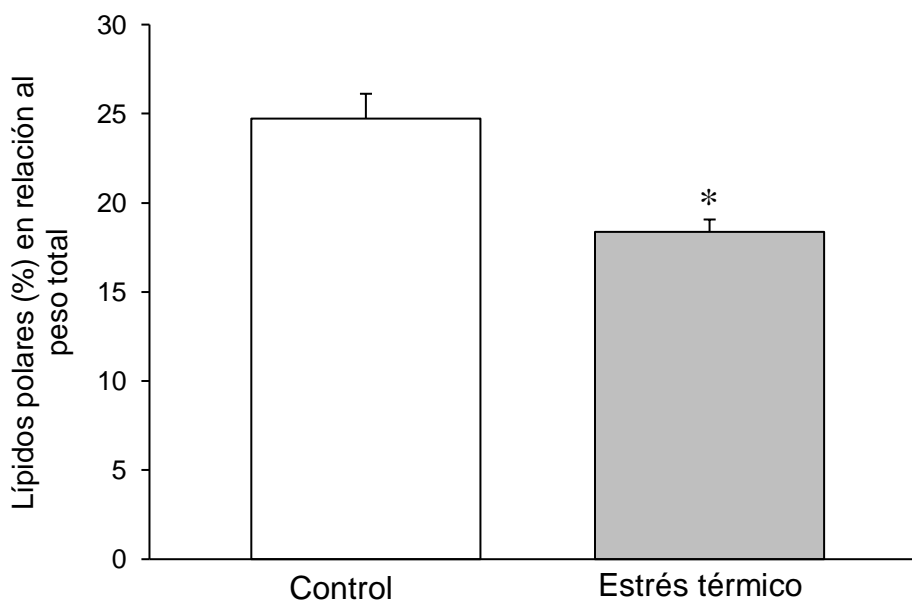


Figura 26. Porcentaje de lípidos polares en relación al peso seco total del organismo en semillas de ostión a temperatura control y sometidas a estrés térmico determinados por el método gravimétrico (*t-test* $P \leq 0.05$).

Tabla VII. Proporción (%) de ácidos grasos en LN de semilla de ostión *C. gigas* a temperatura control y sometida a estrés térmico.

Ácido graso	Control	Estrés térmico	Valor de P
14:0	4.4 ± 0.24	3.2 ± 0.26	0.02
15:0	0.4 ± 0.00	0.4 ± 0.01	N.S.
16:0	12.4 ± 0.25	11.8 ± 0.26	N.S.
17:0	0.4 ± 0.02	0.5 ± 0.01	0.01
18:0	4.1 ± 0.21	5.3 ± 0.17	0.02
20:0	0.1 ± 0.00	0.1 ± 0.01	N.S.
22:0	0.2 ± 0.00	0.3 ± 0.01	0.03
24:0	0.2 ± 0.01	0.4 ± 0.02	0.001
14:1n-8	0.1 ± 0.01	0.07 ± 0.01	N.S.
15:1n-8	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01	N.S.
16:1n-9	2.6 ± 0.18	3.2 ± 0.15	N.S.
16:1n-7	16.6 ± 1.32	11.7 ± 0.89	0.04
16:1n-5	0.3 ± 0.01	0.3 ± 0.01	N.S.
17:1n-8	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	N.S.
18:1n-9	1.9 ± 0.10	1.9 ± 0.11	N.S.
18:1n-7	8.8 ± 0.06	10.1 ± 0.46	0.04
18:1n-5	0.2 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00
20:1n-11	1.5 ± 0.10	2.0 ± 0.07	0.02
20:1n-9	0.7 ± 0.06	0.8 ± 0.02	N.S.
20:1n-7	3.8 ± 0.24	4.6 ± 0.16	N.S.
22:1n-9	0.3 ± 0.13	0.4 ± 0.01	N.S.
24:1n-9	0.09 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.02
18:2n-6	1.7 ± 0.09	1.6 ± 0.06	N.S.
18:3n-6	1.1 ± 0.09	0.8 ± 0.03	N.S.
18:3n-3	0.8 ± 0.08	0.8 ± 0.05	N.S.
18:4n-3	1.1 ± 0.06	0.1 ± 0.01	N.S.
20:2n-6	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	N.S.
20:3n-6	0.3 ± 0.03	0.3 ± 0.00	N.S.
20:3n-3	0.3 ± 0.03	0.4 ± 0.13	N.S.
20:4n-6	6.6 ± 0.17	6.6 ± 0.14	N.S.
20:5n-3	15.5 ± 0.16	14.6 ± 0.13	0.01
21:4n-6	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	N.S.
22:4n-6	1.2 ± 0.08	1.6 ± 0.08	0.02
22:5n-6	0.08 ± 0.01	0.1 ± 0.00	N.S.
22:5n-3	0.0 ± 0.00	0.5 ± 0.51	N.S.
22:6n-3	11.6 ± 0.85	13.8 ± 0.85	N.S.
SAT.	22.5 ± 0.26	22.0 ± 0.59	N.S.
MUFA	37.2 ± 0.68	35.4 ± 0.18	N.S.
PUFA	40.4 ± 0.91	42.6 ± 0.77	N.S.
HUFA	36.1 ± 0.84	38.2 ± 0.60	N.S.
(n-3)/(n-6)	2.4 ± 0.09	2.5 ± 0.07	N.S.
Sat index	231.3 ± 4.51	242.1 ± 3.76	N.S.
20:4/20:5	0.42 ± 0.01	0.5 ± 0.01	N.S.

Notas: Resultados expresados en medias ± E.E. Medias con un valor de P menor a 0.05 son estadísticamente diferentes.

Tabla VIII. Proporción (%) de ácidos grasos en LP de semillas de ostión a temperatura control y sometida a estrés térmico.

Ácido graso	Control	Estrés térmico	Valor de P
14:0	2.6 ± 0.34	2.0 ± 0.16	0.02
15:0	0.5 ± 0.03	0.5 ± 0.04	N.S.
16:0	13.6 ± 1.54	13.7 ± 0.47	N.S.
17:0	0.7 ± 0.07	0.7 ± 0.03	N.S.
18:0	8.0 ± 1.27	7.1 ± 0.36	N.S.
20:0	0.1 ± 0.02	0.1 ± 0.01	N.S.
22:0	0.3 ± 0.04	0.4 ± 0.06	N.S.
24:0	1.7 ± 0.49	1.3 ± 0.39	N.S.
14:1n-8	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.03
15:1n-8	3.9 ± 0.05	0.1 ± 0.03	0.04
16:1n-9	4.9 ± 0.10	3.4 ± 0.57	N.S.
16:1n-7	6.1 ± 0.43	6.2 ± 0.17	N.S.
16:1n-5	0.2 ± 0.03	0.2 ± 0.01	N.S.
17:1n-8	0.05 ± 0.02	0.1 ± 0.01	N.S.
18:1n-9	2.2 ± 0.10	2.9 ± 0.33	N.S.
18:1n-7	7.5 ± 0.59	9.9 ± 0.64	N.S.
18:1n-5	0.8 ± 0.13	0.5 ± 0.05	N.S.
20:1n-11	1.8 ± 0.23	1.9 ± 0.28	0.03
20:1n-9	0.6 ± 0.08	0.5 ± 0.05	N.S.
20:1n-7	3.6 ± 0.31	3.6 ± 0.21	N.S.
22:1n-11	0.1 ± 0.08	0.03 ± 0.03	N.S.
22:1n-9	2.4 ± 0.86	1.5 ± 0.22	N.S.
24:1n-9	0.3 ± 0.06	0.3 ± 0.03	N.S.
18:2n-6	2.1 ± 0.10	2.8 ± 0.23	N.S.
18:3n-6	0.9 ± 0.09	1.1 ± 0.06	N.S.
18:3n-3	0.6 ± 0.09	1.1 ± 0.10	N.S.
18:4n-3	0.9 ± 0.09	1.1 ± 0.14	N.S.
20:2n-6	0.3 ± 0.11	0.3 ± 0.16	N.S.
20:3n-6	0.3 ± 0.02	0.3 ± 0.01	N.S.
20:3n-3	2.3 ± 1.08	2.9 ± 0.32	N.S.
20:4n-6	5.7 ± 0.38	7.0 ± 0.09	N.S.
20:5n-3	11.4 ± 1.62	12.7 ± 0.45	N.S.
21:4n-6	0.06 ± 0.06	0.1 ± 0.01	0.00
22:4n-6	2.00 ± 0.18	1.9 ± 0.18	N.S.
22:5n-6	0.09 ± 0.08	0.00 ± 0.00	N.S.
22:5n-3	1.1 ± 0.23	1.1 ± 0.11	N.S.
22:6n-3	9.4 ± 2.11	10.6 ± 0.31	N.S.
SAT.	27.9 ± 3.74	26.0 ± 1.05	N.S.
MUFA	34.6 ± 0.28	31.1 ± 0.57	N.S.
PUFA	37.6 ± 3.48	42.9 ± 0.49	N.S.
HUFA	30.6 ± 4.32	34.4 ± 0.75	N.S.
(n-3)/(n-6)	2.1 ± 0.19	2.0 ± 0.06	N.S.
Sat index	206.7 ± 20.97	225.9 ± 3.80	N.S.
20:4/20:5	0.5 ± 0.04	0.6 ± 0.02	N.S.

Notas: Resultados expresados en medias ± E.E. Medias con un valor de P menor a 0.05 son estadísticamente diferentes.

7.1.5.3 Ácido araquidónico (ARA)

Se observó una concentración significativamente mayor de ARA en LN, siendo significativamente mayor en el tratamiento control (1,023 mg 100g⁻¹) seguido del tratamiento estrés térmico (616 mg 100g⁻¹, Fig. 27).

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas de ARA en los LP, aún que si hubo una concentración de ARA ligeramente más baja en tratamiento estrés térmico de la fracción polar (50.0 mg 100g⁻¹) en comparación con la concentración (42.4 mg 100g⁻¹) en los lípidos polares de los organismos control (Fig. 28).

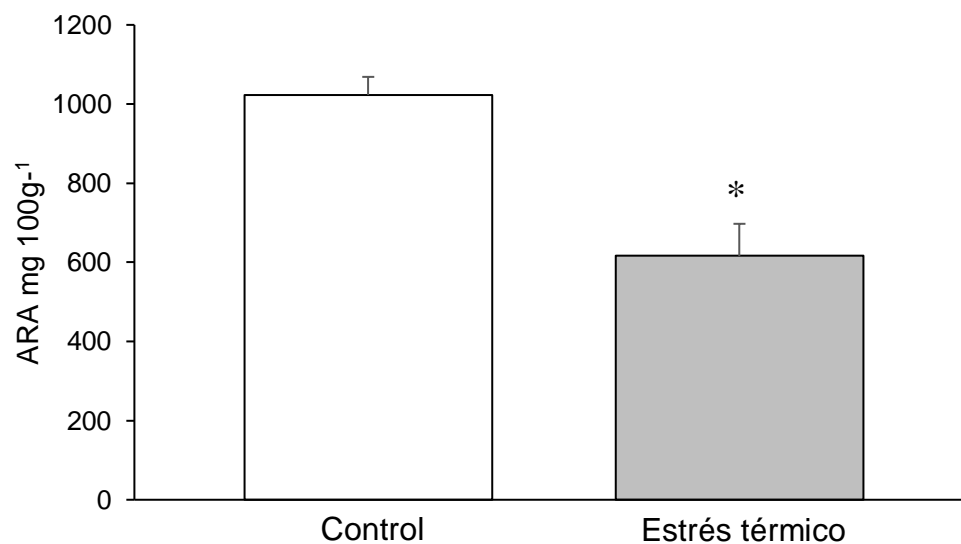


Figura 27. Concentración (mg 100 g⁻¹) de ARA (20:4n-6) en LN de semillas de ostión a temperatura ambiente y sometidas a estrés térmico (Medias ± E.E, n=3) ($P \leq 0.05$).

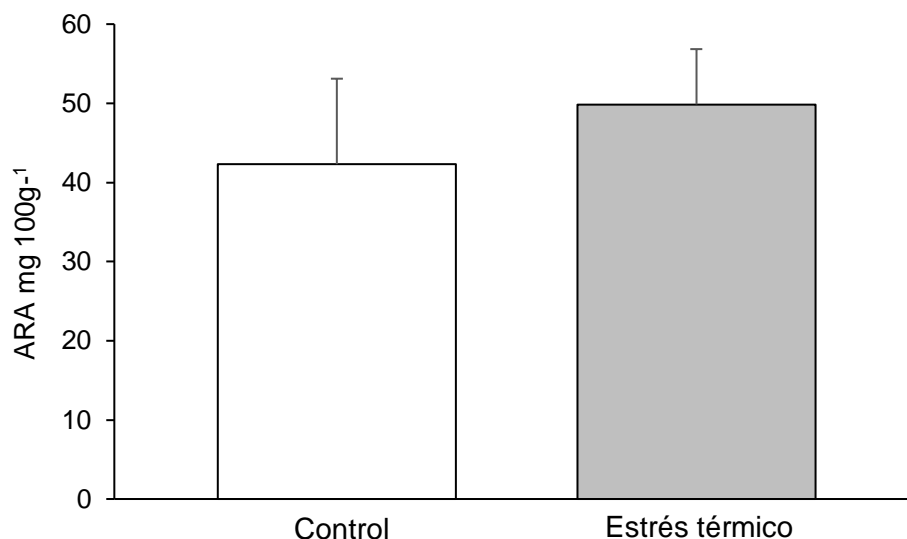


Figura 28. Concentración (mg 100 g⁻¹) de ARA (20:4n-6) en LP de semillas de ostión a temperatura ambiente y sometidas a estrés térmico (Medias \pm E.E, n=3) ($P \leq 0.05$).

7.1.6 Isótopos estables

7.1.6.1 Semilla de ostión

En la Tabla IX se muestran valores obtenidos en porcentaje de átomos de ¹³C en ácidos grasos de LN para el tratamiento estrés térmico y para el control, así como su respectivo valor de P. Diferencias significativas fueron observados para los siguientes ácidos grasos: el 16:1n-7, 20:1n-11 + 20:1n-9, 22:5n-6 y 22:5n-3, 20:1n-7 NMI y 18:2n-6 mientras que para el resto de los ácidos grasos no se observaron diferencias significativas. Para la fracción polar (Tabla X) se observaron diferencias significativas en los siguientes ácidos grasos 16:0, 18:0, 18:0 DMA, 20:1n-7, 20:1n-11 + 20:1n-9, 18:2n-6, 18:4n-3, 20:4n-6, 20:5n-3 y 22:6n-3.

Tabla IX. Proporción (%) de átomos de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ en LN.

Ácido graso	Control	Estrés térmico	Valor de P
14:0	73.42 ± 0.40	72.11 ± 0.87	N.S.
16:0	44.23 ± 0.46	43.36 ± 1.73	N.S.
18:0	29.24 ± 0.99	23.38 ± 1.32	0.00
18:0 DMA	7.58 ± 0.33	8.78 ± 0.40	0.04
16:1n-7	69.09 ± 0.69	75.95 ± 0.43	0.00
18:1n-7	49.14 ± 0.37	52.40 ± 1.03	0.08
18:1n-9 + 18:3n-3	26.46 ± 1.01	23.67 ± 1.08	0.01
20:1n-11 + 20:1n-9	5.54 ± 0.30	9.73 ± 0.48	0.00
20:1n-7	17.54 ± 0.31	21.71 ± 1.11	0.00
18:2n-6	35.94 ± 0.90	32.97 ± 0.29	0.01
18:4n-3	7.38 ± 0.47	8.43 ± 0.42	N.S.
20:4n-6	55.80 ± 1.10	53.03 ± 0.74	0.05
20:5n-3	43.62 ± 0.94	44.40 ± 0.61	N.S.
22:5n-6	2.82 ± 0.24	2.15 ± 0.00	0.01
22:6n-3	14.23 ± 0.66	15.30 ± 1.06	N.S.
22:5n-3	20.09 ± 0.94	16.94 ± 0.00	0.00
22:2 NMI j	5.46 ± 0.07	6.58 ± 0.42	0.02

Notas: Resultados expresados en medias ± E.E. Medias con un valor de $P < 0.05$ son estadísticamente diferentes.

Tabla X. Proporción (%) de átomos de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ en LP.

Ácidos grasos	Control	Estrés térmico	Valor de P
16:0	37.84 ± 1.10	36.70 ± 0.33	0.05
18:0	15.63 ± 0.57	17.18 ± 0.18	0.02
18:0 DMA	6.75 ± 0.20	7.25 ± 0.38	0.00
16:1n-7	73.71 ± 0.45	72.54 ± 0.87	N.S.
18:1n-7	46.54 ± 1.02	50.23 ± 0.51	N.S.
18:1n-9+18:3n-3	21.92 ± 1.56	15.10 ± 1.24	N.S.
20:1n-7	14.38 ± 0.50	14.29 ± 0.62	0.00
20:1n-11 + 20:1n-9	5.71 ± 0.15	6.01 ± 0.53	0.00
18:2n-6	21.70 ± 0.60	31.92 ± 0.93	0.00
18:4n-3	7.18 ± 0.23	8.40 ± 0.53	0.00
20:4n-6	43.35 ± 0.69	43.23 ± 0.46	0.06
20:5n-3	35.88 ± 0.77	34.22 ± 0.47	0.89
22:6n-3	15.50 ± 0.63	12.52 ± 1.72	0.07
22:2 NMI j	5.65 ± 1.57	3.74 ± 0.34	N.S.

Notas: Resultados expresados en medias ± E.E. Medias con un valor de $P < 0.05$ son estadísticamente diferentes.

7.1.7 Análisis del metabolito de prostaglandina E (PGEM)

La concentración de la prostaglandina E₂ (PGEM) fue significativamente diferente entre los tratamientos. Los organismos del tratamiento estrés térmico presentaron una concentración de PGEM mayor (2.5 pg g⁻¹) mientras que el tratamiento control presentó una concentración de 0.32 pg g⁻¹ como se observa en la Fig. 29.

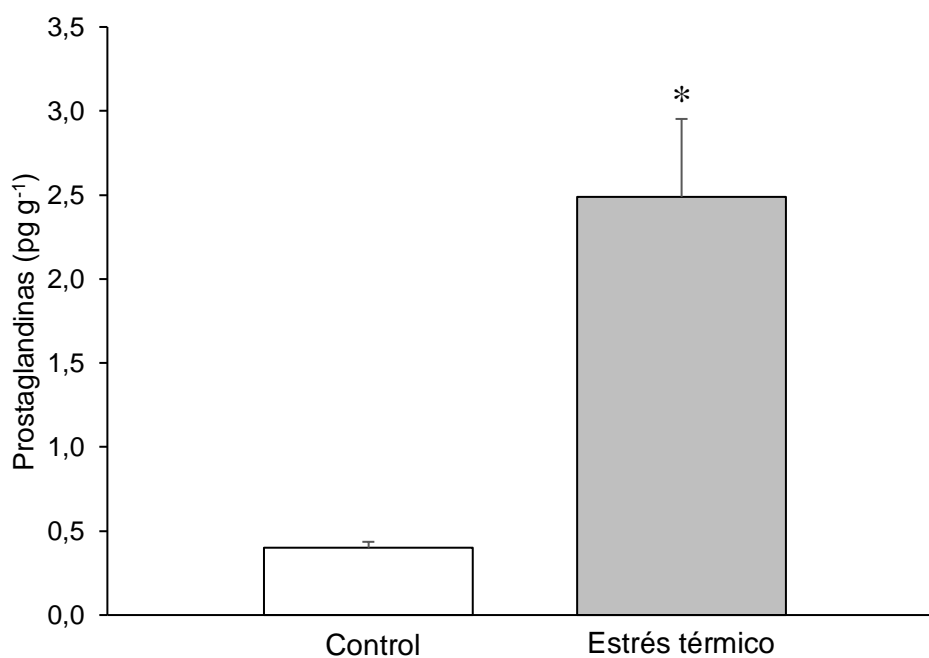


Figura 29. Concentración del metabolito de prostaglandina E (pg g⁻¹) en tejidos de semillas de ostión *C. gigas* a temperatura control y sometidas a estrés térmico determinado por kit comercial EIA. Resultados expresados en medias \pm E.E. * Indica las diferencias significativas (*t-test* $P \leq 0.05$)

7.2 ARA marcado con ^{13}C .

7.2.1 Isótopos estables

No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de átomos de ^{13}C en el ácido araquidónico (ARA, 20:4n-6) entre las semillas del tratamiento control como aquellas sometidas a un estrés térmico. Lo anterior se observó tanto en la fracción neutra (Fig. 30), como en la fracción polar (Fig. 31) de los lípidos.

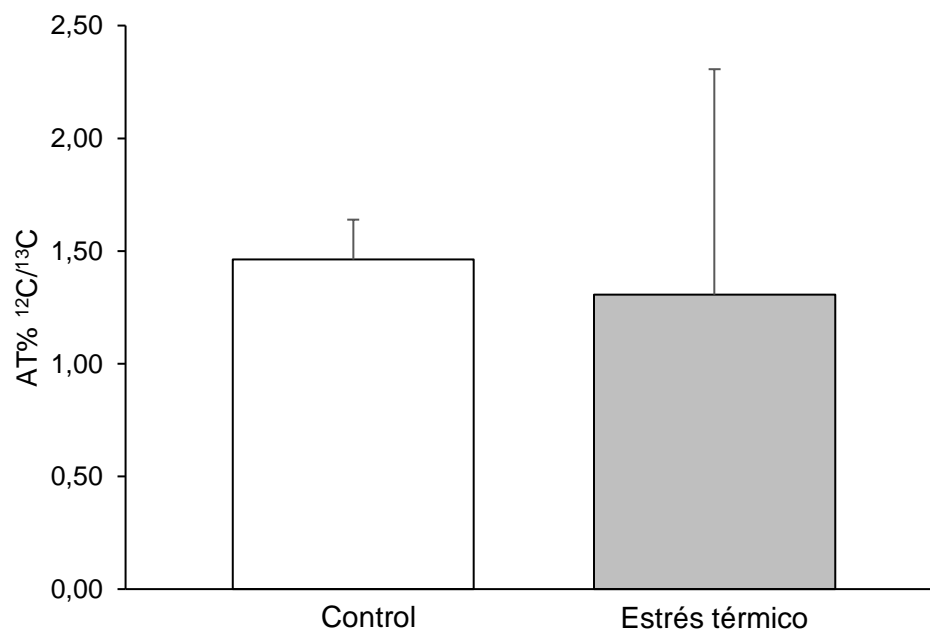


Figura 30. Porcentaje de átomos de ^{13}C en LN en semillas de ostión *C. gigas* a temperatura control y sometidas a estrés térmico. Resultados expresados en medias \pm E.E.

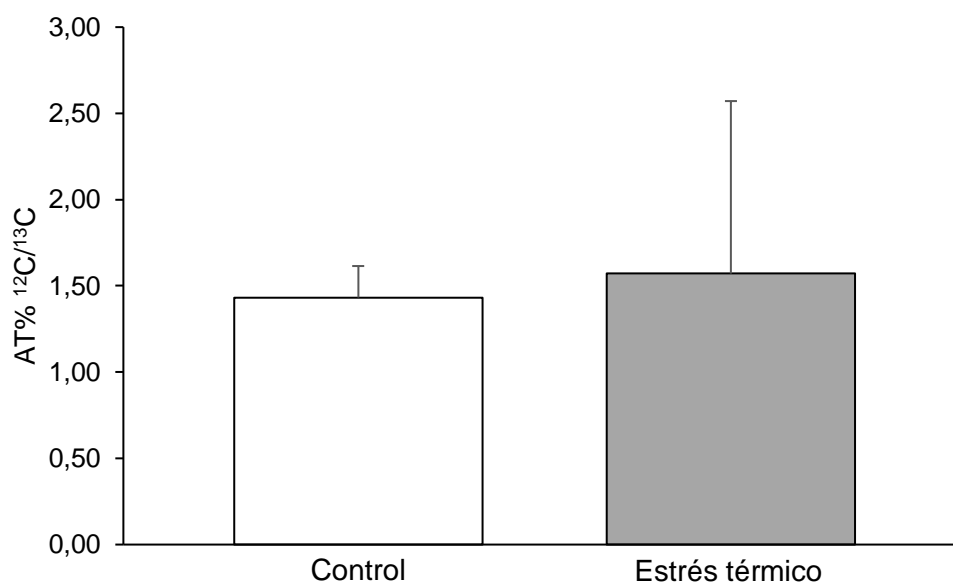


Figura 31. Porcentaje de átomos de ¹³C en LP en semillas de ostión *C. gigas* a temperatura control y sometidas a estrés térmico. Resultados expresados en medias ± E.E.

8. DISCUSIÓN

La alimentación en los moluscos bivalvos es principalmente controlada por factores ambientales como temperatura y salinidad (Gosling 2003; Sara *et al.*, 2008). Aquí, observamos un fuerte efecto del estrés térmico sobre el consumo de alimento de los ostiones: Al suministrar la microalga *C. muelleri* ¹³C el primer día del experimento, los ostiones sometidos a estrés térmico disminuyeron el consumo de microalga, esto se ha observado en la mayoría de los organismos estudiados, que disminuyen la ingesta de alimento ante rápidos cambios térmicos en el medio ambiente (Cáceres-Puig *et al.*, 2007; Rico-Villa *et al.*, 2009; Guzmán-Agüero *et al.*, 2013). Sin embargo, durante el segundo y tercer día del experimento, los ostiones sometidos a estrés térmico incrementaron el consumo de alimento respecto a los ostiones del grupo control. Observaciones similares de incremento de la ingestión o consumo de alimento con el incremento de la temperatura se han reportado por Rico-Villa *et al.* (2009) en larvas de ostión *C. gigas* y podría atribuirse a que, el estar bajo una condición estrés involucra que el organismo tiene que responder activando una amplia variedad de mecanismos para contrarrestar el efecto del estrés, para lograr lo anterior, posiblemente una mayor demanda de energía es requerida (Giomi *et al.*, 2016), la cual es obtenida a través del incremento en la alimentación, además de que un incremento de temperatura también induce un incremento en la tasa metabólica de los organismos que posiblemente aumenta la actividad ciliar y por lo tanto la tasa de filtración.

Al cuarto día del experimento, no se encontraron diferencias significativas en el consumo de alimento entre los ostiones estresados y los ostiones del grupo control, sin embargo, se observó un consumo ligeramente menor en los ostiones estresados, el cual puede deberse a que probablemente a partir del tercer día, el estrés térmico ejerció efectos negativos a nivel de tejidos, como la glándula digestiva, lo cual es corroborado por los resultados histológicos presentes en este trabajo, donde se observa disminución de la altura del epitelio de los túbulos de la glándula digestiva a consecuencia del incremento de la temperatura como se discute a continuación. La glándula digestiva es el principal órgano metabólico de

los moluscos y, por lo tanto, es adecuado estudiarlo para monitorear y estudiar las respuestas celulares al estrés. Una glándula digestiva normal tiene divertículos digestivos, los cuales son túbulos ciegos que consisten primariamente de epitelio de absorción no ciliado intercalado con células secretoras y no diferenciadas y cuyo lumen de los túbulos tiene una forma de cruz característica (Elston, 1999). En los ostiones del grupo control, la histología muestra que la glándula digestiva fue normal, encontrando una mayor altura del epitelio de los túbulos digestivos. En contraste, los ostiones sometidos a estrés térmico presentaron un epitelio con altura significativamente menor y forma del lumen obliterado, también se observó agrandamiento de los túbulos debido a la disminución de la altura epitelial. La disminución en la altura del epitelio de los túbulos digestivos como consecuencia de la exposición a un agente estresor ha sido reportada previamente en organismos terrestres y marinos: Odendaal y Reinecke (2003) observaron lo anterior en una especie de isópodo (*Porcellio laevis*) expuesto a altos niveles de cadmio, como resultado del estrés tóxico. Irinco-Salinas (2012) observó disminución de la altura del epitelio de los túbulos de la glándula digestiva en la almeja *Batissa violácea* colectadas en un área con altos niveles de contaminación antropogénica. Sin embargo, el efecto cuantitativo histológico del estrés térmico sobre los tejidos de moluscos bivalvos ha sido menos estudiado Dittbrenner *et al.* (2008) analizaron la adaptación celular e histopatología posterior a un estrés térmico en diferencias especies de caracoles de tierra, encontrando que aquellos organismos expuestos a estrés térmico presentaron forma irregular de los túbulos de la glándula digestiva en comparación con el control.

Por otro lado, en el presente trabajo se encontró que como respuesta al estrés térmico los ostiones presentaron un mayor número de hemocitos en tejido conectivo (Fig. 18). Ante una respuesta inflamatoria aguda puede ocurrir durante un evento estresante. Los hemocitos son el mecanismo de defensa primaria en los ostiones. Así, la infiltración de hemocitos en los tejidos de ostión puede ser un signo de agotamiento fisiológico o enfermedad. El estrés ambiental puede disminuir la respuesta inmune del ostión, así incrementando la susceptibilidad a enfermedades

en estos organismos (Fogelson *et al.*, 2011). Previamente se ha reportado que el número de hemocitos varía con la temperatura (Carballal *et al.*, 1998; Cáceres-Martínez *et al.*, 2018).

Por otro lado, en ostiones sometidos a estrés térmico, se espera una disminución de reservas energéticas, dado que no hay absorción suficiente en vista del daño a la glándula digestiva. En concordancia, se observaron menores niveles de lípidos neutros (Fig. 25) en las semillas de ostión del tratamiento estrés térmico en comparación con el contenido en ostiones del tratamiento control (25% vs. 17%). Una disminución de los lípidos de reserva (neutros) del 40% y 45% como consecuencia de un estrés térmico 8°C (de 25 a 33°C), ha sido reportado previamente con diferentes especies de corales (*Montipora digitata*, *Acropora intermedia*) (Imbs y Yakovleva (2012). Truzzi *et al.*, (2018) reportaron que un incremento de temperatura de 2°C durante 10 días, afectó el contenido de lípidos totales y la composición de AG en tejido muscular del pez de *T. bernacchii*, observando disminución del contenido de lípidos totales como respuesta a la temperatura; sin embargo, no se realizó una separación de lípidos neutros y polares.

La disminución del contenido de lípidos neutros puede deberse a que para los organismos que se desarrollan a una temperatura alta requieren de un mayor costo energético, pues está ampliamente descrito que con el incremento de temperatura hay un incremento de la tasa metabólica. Esta situación puede determinar un incremento en la tasa metabólica lo que puede ser satisfecho por los TG almacenados en los lípidos de reserva (Seebacher *et al.*, 2005). Está bien establecido que los TG sirven como lípidos de almacenamiento y determinan el balance energético de los organismos (Imbs y Yakovleva 2012). Al respecto, esta disminución de TG fue acompañada por una disminución de la proporción de 16:1n-7 y de algunos ácidos grasos saturados (Tabla VII).

En contraste, se sabe menos sobre los cambios en la cantidad de fosfolípidos en relación a un estrés térmico. Aquí observamos disminución de LP ante un estrés térmico (Fig. 22). Esto podría deberse a la pérdida de tejido en ostiones, como es el

caso de la disminución de la altura epitelial en glándula digestiva, lo cual conlleva una reducción de membrana celular.

Por otro lado, se ha reportado que los ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana cambian en respuesta a un estrés térmico para modular la fluidez de la membrana celular, incrementando la cantidad de ácidos grasos polinsaturados en relación a los saturados (Dubousquet *et al.*, 2016). Sin embargo, en el presente trabajo la composición de ácidos grasos en los fosfolípidos fue muy estable (Tabla VIII). Aún así, se observó un ligero aumento, aunque no significativo, del índice de insaturación en LP en los ostiones sometidos a un estrés térmico.

Sin embargo, contrario a los amplios cambios reportados en la composición de AG en los lípidos polares ante una condición de estrés térmico, para los LN las expectativas con respecto a respuesta al calor son menos claras, dado que los ácidos grasos específicos pueden aumentar o disminuir en las reservas de lípidos en función del equilibrio entre las tasas de movilización para la exportación a otros tejidos, por un lado, en comparación con el aumento de las tasas de biosíntesis o la retención selectiva (Snyder y Schregel, 2012).

Contrariamente a lo esperado, no se observaron diferencias significativas en la proporción de ARA ya sea en LN o LP de los organismos sometidos a un estrés térmico en relación al control, pero si se observó un ligero incremento no significativo de ARA en los LP en ostiones estresados.

Los resultados de ARA en concentración en LN muestran una disminución significativa de ARA (Fig. 23). Lo anterior, concuerda con una disminución de ARA en LN previamente reportada en distintos organismos sometidos a un estrés, como se mencionó en antecedentes. Sin embargo, la concentración de ARA en LP no aumentó significativamente en ostiones sometidos a estrés térmico en comparación con el grupo control, aunque si se observó un ligero incremento.

8.1 Isótopos estables

Por otro lado, en los ácidos grasos marcados no se observaron diferencias significativas en la relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ del ARA en LN o LP, en relación con el estrés,

es decir comparando la relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de ARA de la misma fracción lipídica entre organismos del tratamiento estrés térmico y control. Al respecto, el análisis de isótopos reveló una posible saturación de ^{13}C , lo cual se debe a que la microalga marcada con un alto porcentaje de ^{13}C se ofreció durante varios días a los ostiones. Probablemente, es necesario ofrecer la microalga marcada solamente el último día por un periodo corto para poder ver un efecto sin saturar el equipo, además de que altos niveles de enriquecimiento pueden modificar la termodinámica de las reacciones químicas (Gorokhova, 2017; Basov *et al.*, 2019). Sin embargo; si se observó una diferencia al comparar los valores del porcentaje $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de ARA entre los LN y los LP, la relación del ARA $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ fue un 13% más alto en la LN en comparación con la fracción polar, otros ácidos grasos presentaron diferencias menores como el EPA que presentó una diferencia de 9%, el DHA con una diferencia de 10%, y el 18:2n-6 con una diferencia 4%. Estas diferencias podrían estar indicando diferencias en la regulación y metabolismo de estos ácidos grasos, siendo el ARA el ácido graso que presentó una mayor diferencia, lo cual indicaría mayor movilización entre fracciones, en concordancia con la hipótesis de investigación.

Lo anterior, concuerda con los trabajos mencionados en antecedentes y con trabajos realizados principalmente en células humanas, como el trabajo de Blank *et al.* (1992) quienes de igual manera usaron isótopos como herramienta para ver el metabolismo del ARA *in vitro* con células HL-60 (línea celular de leucemia promielocítica) de humanos. En un primer experimento se incubaron las células en un medio de cultivo con distintas concentraciones de ARA exógeno (10^{-8} y 10^{-5} M, nivel bajo y alto respectivamente), el cual estaba marcado con ^3H (tritio), un isótopo radioactivo, después de 2 horas de incubación, el porcentaje de ^3H celular fue medido en las diferentes clases de lípidos encontrando que para el tratamiento con la concentración más alta de ARA ^3H (10^{-5} M) el porcentaje de ^3H celular fue más alto en los triglicéridos (38%) en comparación con fosfolípidos los cuales presentaron niveles muy bajos (1% de ^3H), es decir, a altas concentraciones de ARA en el medio de cultivo este fue acumulado en los triglicéridos principalmente.

Posteriormente, en un segundo experimento una parte de las células que estaban pre-cargadas con ARA marcado con ^3H fueron cultivadas en un medio libre de ARA, y el resto permaneció bajo las mismas condiciones como control, después de 22 horas de cultivo se observó que el porcentaje de ^3H celular cambió, ahora el porcentaje más alto de ^3H se presentó en diferentes clases de fosfolípidos (46%) y disminuyó en triglicéridos (de 38 a 9%). Es decir, gracias a este análisis usando herramientas isotópicas se observó una clara transferencia de ARA desde los triglicéridos hacia los fosfolípidos.

En un trabajo más reciente, Guijas *et al.* (2019) realizaron experimentos *in vitro* con monocitos humanos con el fin de caracterizar la composición lipídica de los monocitos, específicamente respecto a la distribución del ARA en las diversas clases de lípidos, realizaron un primer experimento en el cual se añadió al medio de cultivo ARA exógeno (10 μM), otro grupo de células fue cultivado desprovisto de una fuente de ARA exógeno como control, después de 2 horas de incubación se encontró que, con la fuente de ARA, los TG fueron la única clase de lípidos que incorporaron cantidades significativas de ARA, mientras que los FL no incorporaron ARA o bien lo hicieron a niveles muy bajos. Los autores hicieron otro experimento para evaluar si el ARA en TG de los monocitos podía ser movilizado bajo estimulación celular usando un activador celular (zimosan), sin embargo; los autores fallaron en demostrar dicha movilización del ARA a partir de TG, pues al analizar los FL y TG posterior a la estimulación celular, se observó que el ARA movilizado fue casi exclusivamente de FL. Sin embargo, a diferencia de nuestra hipótesis, estos y otros autores (Dichlberger *et al.*, 2014) esperan una movilización del ARA directamente en las gotas lipídicas, es decir en los LN, principalmente TG que hacen parte principal del núcleo de estas gotas lipídicas y donde se acumula el ARA y difiere de la nuestra en que aquí sugerimos una movilización del ARA hacia los FL bajo una condición de estrés y/o activación celular para la síntesis de eicosanoides. Resultados relevantes en relación a nuestra hipótesis se encuentran en el trabajo realizado por Johnsson *et al.* (1999) quienes trabajaron *in vitro* con neutrófilos de humanos y realizaron experimentos para determinar si el ARA puede ser movilizado

desde el pool de los TG, y de ser así, si este ARA es metabolizado para formar eicosanoides; para evaluar lo anterior añadieron diferentes niveles de ARA al medio de cultivo (0 μM -control, 5 μM -medio y 20 μM -alto) después de 2 horas de incubación el ARA se acumuló principalmente (70%) en TG, posteriormente, sometieron a las células a una estimulación y se midió la síntesis de eicosanoides observando que con los niveles de ARA alto la capacidad de síntesis de eicosanoides incrementó 2.5 veces respecto al control, sin embargo; se consideró que esta mejora de la síntesis de eicosanoides fue relativamente baja dada la gran cantidad de ARA acumulado en TG.

El fenómeno de acumulación del ARA en TG está bien estudiado en células humanas, sin embargo; el fenómeno de transferencia o movilización a FL para posteriormente sintetizar eicosanoides es menos estudiado, a la fecha, en la literatura se describe que las células del sistema inmune innato poseen toda la maquinaria enzimática necesaria para transferir el ARA desde los TG a los FL por vía de reacciones que son dependientes de CoA. Como se describe en Lebrero *et al.* (2019) “en esta ruta: los lisofosfolípidos que fueron generados por fosfolipasas A_2 constitutivamente activas, como lo es la fosfolipasa A_2 independiente de calcio del grupo VIA (iPLA 2β), son utilizadas por una acil-transferasa dependiente de la coenzima A (CoA) para transferir el ARA en los fosfolípidos. La remodelación posterior a través de reacciones de transacilación entre los FL, distribuye el ARA en las clases de FL apropiadas”. Dichas reacciones podrían explicar un mecanismo probable por el cual el ARA es transferido de los TG a los FL, sin embargo; aparentemente las vías responsables de la liberación de ARA pueden diferir de una manera específica entre tejido y tipo celular (Astudillo, 2011).

8.2 PGEM

La PGEM se sintetizan a partir del ARA que se encuentra unido a FL en la membrana celular: El ARA es liberado por la fosfolipasa A_2 (PLA 2) y es sustrato en el citosol de la enzima ciclooxygenasa (COX) que lo convierte en PGH $_2$, posteriormente la enzima prostaglandina E sintetasa lo transforma en PGE $_2$

(Simmons *et al.*, 2004). En el presente trabajo se observó una concentración significativamente mayor de la PGEM en las semillas de ostión que fueron sometidas a estrés térmico incrementando la temperatura 15°C (3°C/hora). De forma similar, una mayor concentración de la PGE₂ y sobreexpresión de las enzimas que participan en la síntesis de PG como respuesta ante la exposición a estrés térmico ha sido descrita anteriormente. Por ejemplo, Sakai *et al.*, (2018) realizaron un estudio *in vitro* encontrando una mayor concentración de PGE₂ en células del endometrio de vacas después de un incremento de 2°C en la temperatura corporal (de 38.5 a 40.5°C) y manteniendo esta condición durante 14 horas en comparación con el control a 38.5°C y también observó una mayor expresión de enzimas involucradas en la síntesis de PG como la PLA2, ciclooxigenasa-2 (COX-2), prostaglandina F sintetasa (PGFS) y prostaglandina E sintetasa (PGES). Mondal *et al.* (2017) midieron la concentración de PGF_{2α} en el epitelio uterino de oveja al incrementar 2°C la temperatura corporal (de 38.5 a 40.5°C) y manteniendo este tratamiento térmico durante un periodo de 18 horas, pasadas las cuales se midió la concentración de PGF_{2α}, encontrando una concentración significativamente mayor con respecto al control. Kobayashi *et al.* (2013) realizaron un experimento *in vitro* con células del oviducto de bovinos con el objetivo de evaluar el efecto de diferentes temperaturas sobre la producción de PGE₂ encontrando que con un aumento de 2 °C hubo un incremento significativo en la concentración de PGE₂. Sun *et al.* (2015) sometieron a estrés térmico a pollos de engorda incrementando 9°C la temperatura ambiental (de 25 a 34°C) durante 24 horas y observaron que la enzima COX-2 fue sobre-expresada bajo la condición de estrés térmico. Sin embargo, dichos estudios han sido llevados a cabo mayormente en vertebrados terrestres, además se han analizado desde el punto de vista de la reproducción.

Además de los estudios antes mencionados, existen reportes de estudios referentes a PG en moluscos bivalvos; sin embargo, estos se han enfocado principalmente en su papel en la reproducción, ya sea en procesos como el desove (Morse *et al.*, 1977; Morse *et al.*, 1978; Munro *et al.*, 1983, Ruggeri y Thoroughgood, 1985; Matsutani y Nomura, 1987; Osada y Nomura 199; Martínez *et al.*, 2000; Caers

et al., 2002), ciclo reproductivo (Osada y Nomura, 1990) o regulación de la gametogénesis (Deridovich y Reunova, 1993; Martínez *et al.*, 2000; Hurtado *et al.*, 2009). Por otro lado, el incremento de PG en moluscos, particularmente la PGE₂ posterior a un estrés térmico, no se ha descrito ampliamente en la literatura. Sin embargo, se ha reportado que la PGE₂ está involucrada en el estrés osmótico (Freas y Gorllman 1981; Saintsing *et al.*, 1983), por lo que las PG además de estar involucradas en los procesos reproductivos, también juegan un papel importante en la respuesta al estrés, y, por lo tanto, el aumento en la concentración de PGE₂ encontrado en el presente estudio puede indicar la atenuación de condición de estrés osmótico o bien que juega un papel crucial en la aclimatación del animal al estrés térmico. En relación a la respuesta inmune se observó que dietas suplementadas con ARA tienen efectos sobre parámetros de respuesta inmune, se cree que esto podría estar mediado por las PG (Delaporte *et al.*, 2006). De continuidad al trabajo anterior Segueineau *et al.* (2011) analizaron el efecto de suministrar distintos niveles de ARA (0, 0.25 y 0.41 µg/ml) sobre la producción de prostaglandinas y parámetros de estrés oxidativo en ostiones, para esto, realizaron un experimento *in vivo* con adultos de *C. gigas* suministrando el ARA durante 30 días, pasados los cuales los organismos del tratamiento control (sin ARA) disminuyeron el contenido de ARA en comparación con los niveles al inicio del experimento, mientras que, para el tratamiento 0.25 y 0.41 µg/ml hubo un incremento significativo respecto a los organismos del tratamiento control. La proporción de ARA fue mayor en FL. No se encontraron diferencias significativas en la peroxidación lipídica ni actividad de enzimas antioxidantes. Los resultados indican que las respuestas inmunes reportadas previamente (Delaporte *et al.*, 2006) no pueden atribuirse a un aumento general del estrés oxidativo. Se sugiere en próximos experimentos el uso de inhibidores de COX.

La mayor concentración de PGEM reportada en este trabajo, puede ser resultado de una mayor expresión de las enzimas que sintetizan las PG. El efecto del estrés térmico sobre las enzimas asociadas a la síntesis de PG ha sido previamente reportado en células bovinas (Sakai *et al.*, 2018). Por otro lado, el

incremento de la concentración PGE_2 en organismos expuestos a estrés térmico se ha atribuido a que el calor induce a alteraciones en la membrana resultando en un incremento de la movilización de sustrato para la biosíntesis de PG (Amitha *et al.*, 2019). El aumento en el recambio de los FL de membrana inducido por el calor y la liberación de ARA pueden proporcionar el sustrato para la síntesis de PG (Mondal *et al.*, 2017).

Se ha descrito que las PG inducen a la síntesis de HSP como un mecanismo de citoprotección, y en particular, la síntesis de la HSP70. Para evaluar si la PGE_2 potencia la expresión de HSP, Shah *et al.* (2010) en un estudio *in vitro* con células humanas del epitelio alveolar basal evaluaron la respuesta al choque térmico (incremento de 10°C , de 32 a 42°C , 4 horas) y encontraron que incrementa la producción de PGE_2 , pero que además al añadir PGE_2 de una fuente exógena, aumentó la expresión génica de HSP70 dependiente del factor del HSF-1, mientras que al añadir un inhibidor de COX, como lo es ibuprofeno, se atenuó la expresión génica. Otros estudios que han evaluado la relación entre PG y HSP son en su mayoría *in vitro* y se han llevado a cabo en diferentes tejidos como monocitos humanos (Elia *et al.*, 1999), células de músculo liso de ratón (Hamel *et al.*, 2000), cardiomiocitos de rata (Cornelussen y Knowlton, 2001), osteocitos de ratón (Tokuda *et al.*, 2002) células musculares humanas (Hamel *et al.*, 2000), fibroblastos de bovinos (Richter *et al.*, 2014) y células endoteliales humanas (Caldas *et al.*, 2018). En concordancia, en el presente trabajo además de los altos niveles de PGE_2 , se encontraron niveles significativamente mayores de expresión de HSP70 en las semillas de ostión sometidas a estrés térmico en comparación con aquellas que permanecieron a temperatura constante, en las cuales no hubo mayor expresión de HSP70. El mecanismo exacto responsable de la activación de HSF-1 por PG es desconocido, pero en algunas PG como la PGA_1 puede ser relacionado a la interacción de PGA_1 con grupos sulfhídricos de proteínas específicas o un efecto directo sobre HSF en el citoplasma y en el núcleo (Cornelussen y Knowlton, 2001).

8.3 Expresión de genes en *C. gigas* por efecto de estrés térmico.

La fluctuación térmica natural de ambientes marinos induce cambios fisiológicos en ectotermos; si los cambios ambientales persisten, se requieren ajustes a nivel molecular y entre otros en expresión de genes. Estudios comparativos de la expresión de genes pueden ser utilizados para caracterizar estos ajustes y llevar a comprender mejor la respuesta del organismo a los cambios ambientales. Alteraciones en la expresión génica han sido observadas en peces y crustáceos (Atkinson, 2012), sin embargo, pocas investigaciones a nivel molecular se han centrado sobre la respuesta al estrés térmico en bivalvos, particularmente en el contexto de cambio climático y los efectos potenciales sobre invertebrados marinos (Ang-lu *et al.*, 2015; Lewis *et al.*, 2016).

8.3.1 Expresión de HSP

Uno de los efectos más interesantes, es la expresión de proteínas de choque térmico (HSP), que son las proteínas que ayudan al organismo a modular la respuesta de estrés, en particular, pero no limitado a estrés térmico y ofrecen protección contra cambios ambientales que pudieran inducir daño a nivel celular (Sørensen *et al.*, 2003). Cabe mencionar que las funciones de las HSP no solo pueden ser observadas a nivel molecular y celular, sino que por otra parte la inducción de estas proteínas representa un instrumento adaptativo para organismos que enfrentan el estrés térmico como un posible mecanismo para condiciones ambientales adversas (i.e. cambios temperatura), además de tener implicaciones ecológicas y biogeográficas para establecer los límites de distribución de los organismos por termo tolerancia. De esta familia de proteínas, el grupo de las HSP70 juega un papel importante como chaperonas moleculares en las células, incluyendo el plegamiento *de novo* de proteínas, translocación de membranas, degradación de proteínas mal plegadas y otros procesos de regulación (Kergel, 2002). Las HSP70 pueden ser inducidas por diversos estresores ambientales como metales pesados, pesticidas, patógenos, toxinas, hipoxia y temperatura (Zhang y Zhang, 2012). El incremento en los niveles de expresión de las diversas formas de

la familia de HSP por efecto de estrés térmico ha sido previamente reportado en diversas especies de moluscos como *Ostrea edulis* sometido a diferentes temperaturas (15 a 38°C) por un tiempo mínimo de 15 minutos y máximo una hora (Piano *et al.*, 2002), *Mytilus galloprovincialis* (Anestis *et al.*, 2007) y en diversas especies de ostiones como en juveniles de *C. gigas* sometido a incrementos severos de temperatura de entre 20 y 40°C durante una hora (Hamdoun *et al.*, 2003) y en ostiones adultos posterior a un choque térmico de 19°C (de 18 a 37°C) durante un lapso de una hora (Farcy *et al.*, 2009) en *C. virginica* (Ivanina *et al.*, 2009) y *C. hongkongensis* (Zhan y Zhang, 2012).

En el presente estudio, genes de la familia de HSP70 mostraron una fuerte respuesta, con cambios en los niveles de mRNA 2.58 veces mayor en organismos expuestos a un estrés térmico con respecto al grupo control (Fig. 15). Estudios similares realizados en *C. gigas* coinciden con los resultados obtenidos en el presente estudio: Clegg (1998) reportó un incremento en los niveles de expresión de las HSP70 en *C. gigas* posterior a la exposición a un estrés térmico agudo (1 hora) incrementando la temperatura 25°C (de 12 a 37°C). Este autor comenta que en *C. gigas* se encuentran dos isoformas constitutivas y una inducible de HSP70. Hamdoun *et al.* (2003) observaron que el nivel de expresión de las formas constitutivas de la HSP70 incrementa después de la exposición a un incremento de temperatura de 27 y 20°C durante 1 hora (de 13 a 40 y 43°C, respectivamente) mientras que la forma inducible es expresada solo ante exposiciones mayores a 32°C. Por lo tanto, debido a que en el presente trabajo de investigación el estrés térmico aplicado a los ostiones incrementó 15°C en un lapso de 5 horas de exposición, es posible que la alta expresión de HSP70 observada en el grupo de organismos estresados corresponda tanto a la expresión inducible como a alguna isoforma constitutiva.

8.3.2 Expresión de genes asociados al estrés oxidativo (SOD y GST)

Los organismos marinos están frecuentemente expuestos a fuentes naturales que incrementan la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Algunas de estas fuentes naturales incluyen patógenos y estrés físico como salinidad, hipoxia y estrés térmico. Cada uno de estos tipos de estrés conlleva una aceleración del metabolismo para incrementar la producción de energía para las células. Algunos contaminantes, tales como los metales pesados, también incrementan la producción de ROS, ya que los metales pesados son fuertes oxidantes, la oxidación de moléculas puede generar ROS. La acumulación excesiva de ROS en la célula lleva a una condición de estrés oxidativo que es un estado de desbalance en la oxidación en los tejidos, lo que puede deberse a una peroxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Di-Giulio *et al.*, 1989). Estudios previos han mostrado que alteraciones significativas existen en la producción de ROS y la expresión o actividad de enzimas antioxidantes en diversos organismos marinos en respuesta a factores físicos como la temperatura (Power y Sheehan, 1996; Abele *et al.*, 1998; Heise *et al.*, 2003). La actividad antioxidante de la enzima Gultation-S-transferasa (GST) inducida por estrés térmico ha sido estudiada en diversas especies de moluscos y se ha propuesto como una de las enzimas más sensibles al estrés térmico entre las enzimas antioxidantes estudiadas (Manduzio *et al.*, 2005). En el presente estudio, la expresión del gen GST incrementó 2.11 veces en el grupo de organismos estresados con respecto del grupo control. También se observó un incremento 2.47 veces mayor en el número de transcritos mRNA del gen para SOD en ostiones sometidos a un estrés térmico con respecto de los organismos del grupo control. Los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden con los reportados por Kim *et al.* (2009) donde reportan un incremento significativo en la expresión de la enzima GST en el molusco *Laternula elliptica* en un experimento de incremento de temperatura de 9°C (de 1 a 10°C) después de 12 horas de exposición. Por lo tanto, es posible que, en estadios tempranos de exposición a altas temperaturas, el estrés oxidativo no se manifiesta porque es controlado por enzimas antioxidantes ya presentes, pero ante un continuo estrés causado por

exposición a altas temperaturas se deben incrementar los niveles de expresión lo que redundará en una mayor síntesis de enzimas antioxidantes, lo que incrementará la actividad de enzimas antioxidantes para contrarrestar los ROS.

8.3.3 Expresión de ATP sintetasa

Cuando incrementa el metabolismo ante un estrés, hay un costo energético y control del balance entre el suministro de ATP y la demanda energética, principalmente en tejidos como branquias, el cual puede verse alterado durante el estrés térmico. En *C. gigas*, estresores como herbicidas, hidrocarburos, infección con parásitos o hipoxia (Tanguy *et al.*, 2005a; Tanguy *et al.*, 2005b; David *et al.*, 2005) afectan la expresión de genes involucrados en el metabolismo energético. Además de los agentes estresores de origen biótico y abiótico antes mencionados, los resultados presentados en el presente estudio muestran que cambios a nivel de expresión génica de diversos genes involucrados en la regulación del metabolismo puede ocurrir en respuesta a la temperatura. De manera general, una exposición prolongada a un estrés térmico resulta en una rápida inducción de diversas enzimas asociadas a la generación de energía (ATP), incluyendo enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos como la enzima citrato sintasa, lo que sugiere que existe una necesidad de rápida producción de ATP por vía aeróbica (Le Moullac *et al.*, 2007). En una fase temprana del aumento de temperatura, la rápida inducción de lactato deshidrogenasa en branquias puede indicar la activación del metabolismo anaeróbico (Selvakumar y Geraldine, 2003).

En el presente trabajo de investigación observamos que el gen de ATP sintetasa fue sobre expresado 2.05 veces más en el grupo de ostiones estresados con respecto del grupo control (Fig. 20). Lo anterior, concuerda con el trabajo de Harney *et al.* (2016) quienes sometieron a larvas de ostión *C. gigas* a incrementos térmicos encontrando una sobreexpresión de la ATP sintetasa, los resultados fueron contrarrestados a los de Dun *et al.*, (2012) quien reportó una sub-expresión del gen ATP sintetasa posterior a la exposición de un invertebrado marino (*Aiptasia*

pulchella) a un estrés térmico (incremento de 7°C durante 24 horas, de 26°C a 33°C).

8.3.4 Expresión de Glutamina sintetasa (GS)

La glutamina sintetasa (GS) es una enzima que tiene un papel crucial en el metabolismo del nitrógeno, debido a que cataliza la síntesis de glutamina, un aminoácido muy abundante en los tejidos, a partir de glutamato y amonio, dicha reacción implica gasto de una molécula de ATP (Tate *et al.*, 1972). Se ha reportado que la enzima GS responde ante diferentes agentes estresores, aumentando su actividad y/o nivel de expresión, por lo cual, GS se ha usado ampliamente como indicador biológico de ecosistemas acuáticos alterados y como biomarcador de condición de estrés en diversos organismos. Por ejemplo, algunos estudios realizados en *C. gigas* reportan el incremento en la expresión del gen GS por la exposición a diversos agentes estresores como son hidrocarburos (Boutet *et al.*, 2004), pesticidas (Tanguy *et al.*, 2005a), patógenos (Bao *et al.*, 2013) e hipoxia (David *et al.*, 2005). Se ha reportado que los niveles de GS presentan tienen influencia sobre las reacciones de oxido-reducción durante la proliferación celular. Por otra parte, la glutamina puede significativamente incrementar el potencial redox y los niveles de NADH en las células. Estos y otros resultados sugieren que la GS puede estar relacionada con el balance celular redox y en la modulación de la respuesta antioxidante (Matés *et al.*, 2002).

En el presente trabajo se observó un incremento de 2.6 en la expresión del gen GS en los ostiones sometidos a estrés térmico con respecto de los organismos del tratamiento control (Fig. 21). El incremento en la expresión de la GS coincide los resultados obtenidos para *C. gigas* en diversos estudios, donde se ha evaluado su expresión como proteína de respuesta al estrés. Meistertzheim *et al.* (2007) reportaron un incremento en la expresión del gen GS en ostiones *C. gigas* sometidos a un estrés térmico prolongado, encontrando una mayor expresión de este gen a los 14 días de exposición a un incremento de temperatura de 12°C. Por

otra parte, se observó una expresión diferencial de este gen entre diversos tejidos analizados, encontrando una mayor expresión del gen GS en manto y branquias.

En contraste, Genard *et al.* (2012) reportan que una baja expresión del gen GS en larvas ostiones (*C. virginica*) ante una condición de estrés por un agente patógeno (*Vibrio anguillarum*). Resultados similares han sido reportados en larvas moribundas de ostión, lo cual puede reflejar un decremento en la síntesis de proteínas; este fenómeno ha sido observado en caracoles marinos cuando la temperatura se aproxima a niveles letales (Tomanek y Somero, 1999).

8.3.5 Expresión del gen citocromo c oxidasa subunidad I (COI)

El complejo IV, también llamado citocromo c oxidasa es la enzima terminal de la cadena transportadora de electrones (CTE), la cual se lleva a cabo en la membrana interna mitocondrial, siendo la enzima limitante de la velocidad de la CTE (Vogt *et al.*, 2011). La citocromo C oxidasa está compuesta por subunidades, siendo una de las principales la subunidad I o citocromo C subunidad I (COI) y su función es la transferencia de electrones desde el hemo al O₂ para formar H₂O. (Zhao *et al.*, 2019). La citocromo C oxidasa es un enzima que se encuentra altamente regulada (Srinivasan y Avadhani, 2012).

Los resultados de este trabajo muestran una sobreexpresión significativamente mayor de transcritos de mRNA COI en los organismos sometidos a estrés térmico en comparación con los organismos del tratamiento control (Fig. 23). Con respecto a la expresión del gen COI en ostiones, cabe mencionar que el número de trabajos asociados al factor estrés por temperatura que se encuentran publicados en moluscos bivalvos son limitados. A continuación, se encuentran enlistados algunos de los trabajos reportados con bivalvos: Velez *et al.* (2016) evaluaron el efecto del incremento en la temperatura en dos especies de almejas de importancia comercial (*Ruditapes decussatus* y *R. philippinarum*) y observaron una subexpresión del gen COI en ambas especies cuando se sometieron a un incremento en la temperatura de 4°C y 8°C (17°C a 21 o 25°C). Se sabe que la expresión de la subunidad COI es regulada por la concentración de oxígeno

(Roemgens *et al.*, 2011) y, por lo tanto, cuando la concentración de oxígeno es baja, la expresión de este gen es subexpresada. Estos autores argumentan que este fenómeno es producido como resultado de una respuesta conductual de los bivalvos, los cuales cierran sus valvas como mecanismo de respuesta a altas temperaturas (Velez *et al.*, 2016). Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio no coinciden con los obtenidos por Velez *et al.* (2016). En el presente estudio, los ostiones sometidos a un estrés térmico presentaron una mayor expresión del gen COI con respecto del grupo control. Este efecto pudiera atribuirse a diversos factores, uno de ellos corresponde a un incremento en la expresión de la COI, el cual puede asociarse con la protección de la célula ante daños producidos por especies reactivas (ROS) (Srinivasan y Avadhani, 2012). En este sentido, es bien sabido que ante una condición de estrés térmico se incrementa la producción de ROS y por lo tanto se requiere de la producción de enzimas antioxidantes para evitar el daño oxidativo. La activación de la maquinaria antioxidante implica un gasto energético considerable para realizar procesos de protección, reparación y detoxificación celular, lo que explica el incremento en la expresión de la COI para la generación de energía (ATP) (Valera-Alberni y Canto, 2018).

Por otra parte, una alta expresión del gen COI ha sido reportada en diversos trabajos con ostiones y otras especies de bivalvos ante diversos agentes estresores. Como respuesta a exposición toxinas, Romero-Geraldo (2013), realizó un experimento con juveniles de *C. gigas* expuestos a diferentes dosis de un dinoflagelado tóxico (*P. lima*), encontrando una expresión fuertemente regulada del gen COI (dosis alta y media de dinoflagelado tóxico). En un estudio similar, García-Lagunas (2014) reportó que en semillas de ostión *C. gigas* sometidas a un dinoflagelado tóxico (*Gymnodinium catenatum*) incrementó la expresión en el número de transcritos de mRNA COI a los siete días de exposición al dinoflagelado.

Con respecto a la exposición a metales pesados, Navarro (2011) expuso larvas y juveniles de *Dreissena polymorpha* a metales como cadmio, cobre y mercurio y después de un día de exposición, los niveles de mRNA COI se incrementaron significativamente ante la presencia de los tres metales, en

comparación con el tratamiento control. Por ende, la expresión de COI está regulada por los niveles de oxígeno, pero también por el incremento en metabolismo para contrarrestar efectos de diversos tipos de estresores. En nuestro caso particular, dado que había buena oxigenación, el efecto puede deberse más al incremento de temperatura.

9. CONCLUSIONES

1. En los ostiones estresados se observaron cambios en la histología de la glándula digestiva, concretamente, disminución de la altura del epitelio, lo cual concuerda con el comportamiento de alimentación observado en el último día de estrés. Asimismo, se observó un incremento de hemocitos en ostiones sometidos a estrés, concordante con un incremento en la respuesta inmune.
2. Los ostiones sometidos a un estrés térmico presentaron un incremento de PG, HSP, enzimas de estrés oxidativos, ATPasa sintetasa y COI, concordante con respuestas ante un estrés térmico en ostiones.
3. Se observó una disminución de la concentración de ARA en lípidos neutros en ostiones sometidos a un estrés térmico, sin diferencias en los lípidos polares. Esto podría indicar que hay una transferencia de ARA desde TG a FL a medida que el ARA de los FL disminuye durante la producción de PG, para mantener los niveles de ARA en FL estrechamente regulados, y concuerda con la hipótesis de acumulación de ARA en triglicéridos y transferencia durante el estrés a fosfolípidos.
4. No se observaron diferencias significativas en los análisis isotópicos del ARA al comparar el grupo control con estrés térmico, sin embargo; al comparar LN y LP, el ARA presenta un mayor enriquecimiento de ^{13}C en LN, lo cual, va acorde con la hipótesis de acumulación de ARA en LN, e indica diferencias en la regulación de este ácido graso.

10. LITERATURA CITADA

- Abele, D., B. Burlando, A. Viarengo, H. O. Pörtner. 1998. Exposure to elevated temperatures and hydrogen peroxide elicits oxidative stress and antioxidant response in the Antarctic intertidal limpet *Nacella concinna*. *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.* 120(2): 425-435.
- Achard-Joris, M., P. Gonzalez, V. Marie, M. Baudrimont, J.P. Bourdineaud. 2006. Cytochrome c oxidase subunit I gene is up-regulated by cadmium in freshwater and marine bivalves. *BioMetals*.19(3): 237-244.
- Acin-Perez, R., D. L. Gatti, Y. Bai, G. Manfredi. 2011. Protein phosphorylation and prevention of cytochrome oxidase inhibition by ATP: coupled mechanisms of energy metabolism regulation. *Cell Metab.* 13(6): 712-719.
- Aguilar, V., Racotta, I. S., Goytortúa, E., Wille, M., Sorgeloos, P., Civera, R., y Palacios, E. 2012. The influence of dietary arachidonic acid on the immune response and performance of Pacific whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at high stocking density. *Aquac. Nutr.* 18(3):258-271.
- Amitha, J. P., G. Krishnan, M. Bagath, V. Sejian, R. Bhatta. 2019. Heat stress impact on the expression patterns of different reproduction related genes in Malabari goats. *Theriogenology*. 131:169-176.
- An, M. I., C. Y. Choi. 2010. Activity of antioxidant enzymes and physiological responses in ark shell, *Scapharca broughtonii*, exposed to thermal and osmotic stress: effects on hemolymph and biochemical parameters. *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.* 155(1):34-42.
- Anestis, A., A. Lazou, H. O. Pörtner, B. Michaelidis. 2007. Behavioral, metabolic, and molecular stress responses of marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* during long-term acclimation at increasing ambient temperature. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293(2): R911-R921.
- Ang-lu, S., J. Ke-ji, L. Dao-ji. 2015. Effects of heat stress on the mRNA expression of Hsp 70 and Hsp 90 in white shrimp, *Exopalaemon carinicauda*. *Indian J Geo-Mar SCI* 44(10): 1504-1511.

- Arjona, L. O., E. Palacios. 2009. Análisis de ácidos grasos metal-esterificados (Derivatización directa) en alimentos peletizado enriquecido con ácidos. Manual. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. Primera Edición. La Paz, B. C. S. México. Reporte técnico No. 1.
- Arnold, A. A., B. Genard, F. Zito, R. Tremblay, D. E. Warschawski, I. Marcotte. 2015. Identification of lipid and saccharide constituents of whole microalgal cells by ^{13}C solid-state NMR. *Biochim. Biophys. Acta.* 1848(1): 369-377.
- Astudillo, A. M., G. Pérez-Chacón, D. Balgoma, L. Gil-de-Gómez, V. Ruipérez, C. Guijas, M. A. Balboa, J. Balsinde. 2011. Influence of cellular arachidonic acid levels on phospholipid remodeling and CoA-independent transacylase activity in human monocytes and U937 cells. *Biophys. Acta, Lipids Lipid Metab.* 1811(2):97-103.
- Athenstaedt, K., G. Daum. 2006. The life cycle of neutral lipids: synthesis, storage and degradation. *Cell. Mol. Life Sci.* 63(12): 1355-1369.
- Atkinson, B. 2012. Changes in eukaryotic gene expression in response to environmental stress. Amsterdam. Elsevier. 400pp.
- Bao, Y. B., L. Li, M. X. Ye, Y. H. Dong, W. X. Jin, Z. H. Lin. 2013. Expression of glutamine synthetase in *Tegillarca granosa* (Bivalvia, Arcidae) hemocytes stimulated by *Vibrio parahaemolyticus* and lipopolysaccharides. *Genet. Mol. Res.* 12:1143-1154.
- Basov, A., L. Fedulova, E. Vasilevskaya, S. Dzhimak. 2019. Possible mechanisms of biological effects observed in living systems during $^2\text{H}/^1\text{H}$ isotope fractionation and deuterium interactions with other biogenic isotopes. *Molecule.* 24(22):4101.
- Bassim, S., R.W. Chapman, A. Tanguy, D. Moraga, R. Tremblay. 2015. Predicting growth and mortality of bivalve larvae using gene expression and supervised machine learning. *Comp. Biochem. Physiol., Part D: Genomics Proteomics.* 16:59-72.
- Bautista-Romero, Jesús. 2018. Respuestas ecofisiológicas del ostión japonés, *Magallana gigas* (Thunberg, 1973), ante el estrés térmico del noroeste de México. Tesis Doctoral. Tesis (Doctorado en Ciencias). La Paz, México. Universidad Autónoma de Baja California Sur. 112 p

- Beaumont, A.R. 2009. Summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in the Irish Sea: the influence of temperature and nutrients on health and survival. *Aquaculture*. 287(1-2):128-138.
- Becerra, R. E. A., C. Rangel-Dávalos. 1988. Diagnóstico de la situación actual y perspectivas del cultivo de ostión en México. SEPESCA. México. 95pp.
- Bell, J. G., J. R. Sargent. 2003. Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. *Aquaculture*. 218(1-4): 491-499.
- Bishop, S.H., L.L. Ellis, J.M. Burcham. 1983. Amino acid metabolism in mollusks. En: Hochachka, P. *Metabolic Biochemistry and Molecular Biomechanics*. Academic Press. United States. 243-327.
- Blank, M. L., Z. L. Smith, F. Snyder. 1992. Contributing factors in the trafficking of [3H] arachidonate between phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta, Lipids Lipid Metab.* 1124(3):262-272.
- Boutet, I., A. Tanguy, D. Moraga. 2004. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene*. 329:147-157.
- Buczynski, M. W., D. S. Dumlao, E. A. Dennis. 2009. An integrated omics analysis of eicosanoid biology. *J. lipid res.* 50(7):1505-1505.
- Burge, C. A., F. J. Griffin, C. S. Friedman. 2006. Mortality and herpesvirus infections of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Tomales Bay, California, USA. *Dis. Aquat. Org.* 72(1):31-43.
- Burge, C. A., L. R. Judah, L. L. Conquest, F. J. Griffin, D. P. Cheney, A. Suhrbier, B. Vadopalas, G. Olin, T. Renaul, C. S. Friedman. 2006. Summer seed mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg grown in Tomales Bay, California, USA: the influence of oyster stock, planting time, pathogens, and environmental stressors. *J. Shellfish Res.* 26(1):163-173.
- Cáceres-Martínez, J., L.H. Madero-López, G. Padilla-Lardizábal, R. Vásquez-Yeomans. 2016. Epizootiology of *Perkinsus marinus*, parasite of the pleasure oyster *Crassostrea corteziensis*, in the Pacific coast of Mexico. *J. Invertebr. Pathol.* 139:12-18.

- Cáceres-Martínez, J., R. Vásquez-Yeomans, P. Danigo, C. Reyes-Roel. 2018. Histological Alterations in Pacific Oysters *Crassostrea gigas* that Survived a Summer Mortality Event in Baja California, Mexico. *J. Aquat. Anim. Health* 30(1): 31-38.
- Cáceres-Martínez, J., R. Vásquez-Yeomans. 2013. Enfermedades, parásitos y episodios de mortalidad de ostiones de importancia comercial en México y sus implicaciones para la producción. *Cienc. Pesq.* 21:5-48.
- Cáceres-Puig, J. I., F. Abasolo-Pacheco, J. M. Mazón-Suastegui, A. N. Maeda-Martínez, P. E. Saucedo. 2007. Effect of temperature on growth and survival of *Crassostrea corteziensis* spat during late-nursery culturing at the hatchery. *Aquaculture*, 272:1-4), 417-422.
- Caers, M., S. Utting, P. Coutteau, P. Millican, P. Sorgeloos. 2002. Impact of the supplementation of a docosahexaenoic acid-rich emulsion on the reproductive output of oyster broodstock, *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* 140(6):1157-1166.
- Caldas, L. A., D. F. Ferreira, T. R. P. Freitas. 2018. Prostaglandin A1 triggers Mayaro virus inhibition and heat shock protein 70 expression in an epithelial cell model. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 51(5):584-590.
- Carballal, M. J., A. Villalba, C. López. 1998. Seasonal variation and effects of age, food availability, size, gonadal development, and parasitism on the hemogram of *Mytilus galloprovincialis*. *J. Invertebr. Pathol.* 72(3):304-312.
- Carrasco, M. F., P. J. Barón. 2010. Analysis of the potential geographic range of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) based on surface seawater temperature satellite data and climate charts: the coast of South America as a study case. *Biol. Invasions.* 12(8):2597-2607.
- Cassis, D., C. M. Pearce, M. T. Maldonado. 2011. Effects of the environment and culture depth on growth and mortality in juvenile Pacific oysters in the Strait of Georgia, British Columbia. *Aquac. Environ. Interact.* 1(3):259-274.
- Castillo-Durán, A., J. A. Chávez-Villalba, A. Arreola-Lizárraga, R. Barraza-Guardado. 2010. Crecimiento comparativo, condición y supervivencia de juveniles de los ostiones *Crassostrea gigas* y *C. corteziensis* cultivados en verano e invierno. *Cienc. Mar.* 36(1):29-39

- Castillo-Valenzuela, A., A. Sánchez-Paz, R. Castro-Longoria, M. A. López-Torres, J.M. Grijalva-Chon. 2015. Seasonal changes in gene expression and polymorphism of hsp70 in cultivated oysters (*Crassostrea gigas*) at extreme temperatures. *Mar. Environ. Res.* 110:25-32.
- Chávez-Villalba, J. 2014. Cultivo de ostión *Crassostrea gigas*: Análisis de 40 años de actividades en México. *Hidrobiológica*. 24(3):175-190.
- Chávez-Villalba, J., A. Arreola-Lizárraga, S. Burrola-Sánchez, F. Hoyos-Chairez. 2010. Growth, condition, and survival of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* cultivated within and outside a subtropical lagoon. *Aquaculture* 300(1-4):28-136.
- Chávez-Villalba, J., R. Villelas-Ávila, C. Cáceres-Martínez. 2007. Reproduction, condition and mortality of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Sonora, México. *Aquacult. Res.* 38(3): 268-278.
- Clegg, J. S., Uhlinger, K. R., S. A. Jackson, G. N. Cherr, E. Rifkin, C. S. Friedman. 1998. Induced thermotolerance and the heat shock protein-70 family in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 7:21-30.
- Cognie, B., J. Haure, L. Barillé, 2006. Spatial distribution in a temperate coastal ecosystem of the wild stock of the farmed oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*. 259(1-4):249-259.
- Cornelussen, R. N. M., S. Gupta, A. A. Knowlton. 2001. Regulation of prostaglandin A1-induced heat shock protein expression in isolated cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33(8):1447-1454.
- Cotter, E., S. K. Malham, S. O'Keeffe, S. A. Lynch, J.W. Latchford, J. W. King, A. R. Beaumont, S. C. Culloty. 2010. Summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in the Irish Sea: the influence of growth, biochemistry and gametogenesis. *Aquaculture*. 303(1-4):8-21.
- Cuthbert, M. F. 2016. *The prostaglandins: pharmacological and therapeutic advances*. Elsevier. Amsterdam. 344pp.
- David, E., A. Tanguy, K. Pichavant, D. Moraga. 2005. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. *The FEBS J.* 272(21):5635-5652.

- De la Re Vega, E., A. Sánchez-Paz, C. Gallardo-Ybarra, M. A. Lastra-Encinas, R. Castro-Longoria, J. M. Grijalva-Chon, M. A. López Torres, A. D. Maldonado-Arce. 2017. The Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) Hsp70 modulates the Ostreid herpes virus 1 infectivity. *Fish Shellfish Immunol.* 71:127-135.
- Delaporte, M., P. Soudant, C. Lambert, M. Jegaden, J. Moal, S. Pouvreau, L. Dégremont, P. Boudry, J.F. Samain. 2007. Characterization of physiological and immunological differences between Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) genetically selected for high or low survival to summer mortalities and fed different rations under controlled conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 353:45-57.
- Delaporte, M., P. Soudant, J. Moal, E. Giudicelli, C. Lambert, C. Séguineau, J. Samain. F. 2006. Impact of 20: 4n- 6 supplementation on the fatty acid composition and hemocyte parameters of the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Lipids*, 41(6): 567-576.
- Dennis, E. A. 2000. Phospholipase A2 in eicosanoid generation. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 161:32-35.
- Deridovich, I. I., O. V. Reunova. 1993. Prostaglandins: reproduction control in bivalve molluscs. *Comp. Biochem. Physiol., Part A: Mol. Integr. Physiol.* 104(1):23-27.
- Dichlberger, A., S. Schlager, K., Maaninka, W. J., Schneider, P. T. Kovanen. 2014. Adipose triglyceride lipase regulates eicosanoid production in activated human mast cells. *J. Lip. Res.* 55(12): 2471-2478.
- Di-Giulio, R. T., P. C. Washburn, R. J., Wenning, G.W., Winston, C. S. Jewell. 1989. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environ. Toxicol.* 8(12): 1103-1123.
- Dittbrenner, N., R. Lazzara, H. R. Köhler, C. Mazzia, Y. Capowiez, R. Tribskorn. 2008. Heat tolerance in Mediterranean land snails: histopathology after exposure to different temperature regimes. *J. Molluscan Stud.* 75(1):9-18.
- Dubousquet, V., E. Gros, V. Berteaux-Lecellier, B. Viguiet, P. Raharivelomanana, C. Bertrand, G. J. Lecellier. 2016. Changes in fatty acid composition in the giant clam *Tridacna maxima* in response to thermal stress. *Biol. Open.* 5(10):1400-1407.

- Dunn, S. R., M. Pernice, K. Green, O., Hoegh-Guldberg, S. G. Dove. 2012. Thermal stress promotes host mitochondrial degradation in symbiotic cnidarians: are the batteries of the reef going to run out?. *PLoS One*, 7(7): e39024.
- Elia, G., B. Polla, A. Rossi, M. G. Santoro. 1999. Induction of ferritin and heat shock proteins by prostaglandin A1 in human monocytes: Evidence for transcriptional and post-transcriptional regulation. *Eur. J. Biochem.* 264(3):736-745.
- Elston, R. A. 1999. Health management, development and histology of seed oysters. World Aquaculture Society. United States. 110pp.
- Enríquez-Espinoza, T. L., J. M. Grijalva-Chon, R. Castro-Longoria, J. Ramos-Paredes. 2010. *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* in the Gulf of California. *Dis. Aquat. Org.* 89(3), 269-273.
- FAO. (2018). The State of World Fisheries and Aquaculture 2018-Meeting the sustainable development goals.
- FAO. 2009. *Crassostrea gigas*. In Cultured aquatic species fact sheets. Text by Helm, M.M. Edited and compiled by Valerio Crespi and Michael New. 1-10pp.
- FAO. 2012. The state of world fisheries and aquaculture. Opportunities and challenges. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 251pp.
- FAO. 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. In *Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma.* 224pp.
- Farcy, É., C. Voiseux, J. M. Lebel, B. Fiévet. 2009. Transcriptional expression levels of cell stress marker genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to acute thermal stress. *Cell Stress Chaperon.* 14(4): 371-380.
- Fields, P. A., E. M. Burmester, K. M. Cox, K. R. Karch, 2016. Rapid proteomic responses to a near-lethal heat stress in the salt marsh mussel *Geukensia demissa*. *J. Exp. Biol.* 219(17):2673-2686.
- Filgueira, R., T. Guyondet, L.A. Comeau, R. Tremblay. 2016. Bivalve aquaculture-environment interactions in the context of climate change. *GCB Bioenergy.* 22(12):3901-3913.
- Fimbres-Peña, M. T., 1980. Informe anual del Programa ostrícola en el Estado de sonora, Departamento de Pesca 30 pp.

- Fogelson, S. B., F. S. Rikard, Y Brady, R. K. Wallace. 2011. Histopathology of the digestive tissues and whole-body anaerobic bacteria counts of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, after experimental exposure to anoxia. J. Shellfish Res. 30(3): 627-634.
- Folch, J., M. Lees, G. S. Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. Int. J. Biol. Chem. 226(1): 497-509.
- Freas, W., S. Grollman. 1981. Uptake and binding of prostaglandins in a marine bivalve, *Modiolus demissus*. J. Exp. Zool. 216(2), 225-233.
- Friedman, C. S., R. M. Estes, N. A. Stokes, C. A. Burge, J. S. Hargove, B. J. Barber, R. A. Elston, E. M. Burreson, K. S. Reece. 2005. Herpes virus in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* from Tomales Bay, California, coincides with summer mortality episodes. Dis. Aquat. Org. 63(1):33-41.
- Fuhrmann, M., L. Delisle, B. Petton, C. Corporeau, F. Pernet. 2018. Metabolism of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, is influenced by salinity and modulates survival to the Ostreid herpesvirus OsHV-1. Biol. open 7(2): 1-10.
- Gagnaire, B., H. Frouin, K. Moreau, H. Thomas-Guyon, T. Renault. 2006. Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Fish Shellfish Immunol. 20(4):536-547.
- Gaillard, B., T. Meziane, R. Tremblay, P. Archambault, K.K. Layton, A.L. Martel, F. Olivier. 2015. Dietary tracers in *Bathyrca glacialis* from contrasting trophic regions in the Canadian Arctic. Mar. Ecol.: Prog. Ser. 536, 175-186.
- Gallo-García, M. C., M. García-Ulloa, A. Rejón-Aviña, D. E. Godínez-Siordia, A. H. Díaz. 2007. Infestación de espiónidos perforadores en el ostión *Crassostrea gigas* cultivado en la Laguna de Barra de Navidad, Jalisco, México. Rev. A.I.A. 11(3): 63-73.
- Gallo-García, M. D. C., M. García-Ulloa-Gómez, D. E. Godínez-Siordia. 2004. Evaluación de dos tratamientos en la intensidad de gusanos poliquetos asociados a las valvas del ostión *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1873). Cienc. Mar. 30(3): 455-464.
- Gallo-García, M. D., M. G. U. Gómez, D. G. Siordia, K. R. Gómez. 2001. Estudio preliminar sobre el crecimiento y sobrevivencia del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas*

(Thunberg, 1873) en Barra de Navidad, Jalisco, México. *Universidad y Ciencia*, 34(17): 83-91.

- García-Lagunas N. 2014. Cambios en la expresión génica de juveniles de *Crassostrea gigas* ante su exposición al dinoflagelado productor de toxinas paralizantes *Gymnodinium catenatum*. Tesis (Doctor en Ciencias). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. México. 149pp. En: Ramírez, M.Y.P., y S.E.L. Cota. 2012. Biodiversidad y vulnerabilidad de ecosistemas costeros en Baja California Sur. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Primera Edición. México. 450pp.
- Genard, B., D. Moraga, F. Pernet E. David, P. Boudry R. Tremblay. 2012. Expression of candidate genes related to metabolism, immunity and cellular stress during massive mortality in the American oyster *Crassostrea virginica* larvae in relation to biochemical and physiological parameters. *Gene*, 499(1):70-75.
- Giomi, F., C. Mandaglio, M. Ganmanee, G. D. Han, Y. W. Dong, G. A. Williams, G. Sarà. 2016. The importance of thermal history: costs and benefits of heat exposure in a tropical, rocky shore oyster. *J Exp Biol*. 219(5), 686-694.
- Global Invasive Species Database (GISD). 2015. Species profile *Crassostrea gigas*. <http://www.iucngisd.org/gisd/>.
- Goldstein, D. S., I. J. Kopin. 2007. Evolution of concepts of stress. *Stress*, 10(2):109-120.
- Góngora-Gómez, A. M., M. García-Ulloa-Gómez, J. A. Hernández Sepúlveda, A. L. Domínguez Orozco. 2012. Crecimiento del ostión *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1995) cultivado en el estero La Piedra, Sinaloa, México. *A.I.A.* 16(2):91-104.
- Gorokhova, E. 2017. Shifts in rotifer life history in response to stable isotope enrichment: testing theories of isotope effects on organismal growth. *R. Soc. Open Sci.* 4(3):160810.
- Gosling, E. 2003. Bivalve molluscs. Biology, ecology and culture. Wiley-Blackwell, Oxford, 456pp.
- Gouletquer, P., P. Soletchnik, O. Le Moine, D. Razet, P. Geairon, N. Faury, S. Taillade. 1998. Summer mortality of the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* in the Bay of Marennes-Oléron (France). ICES Mariculture Committee CM, Copenhagen, 14-21.

- Guijas, C., M. A. Bermúdez, C. Meana, A. M. Astudillo, L. Pereira, L. Fernández-Caballero, M. A. Balboa, J. Balsinde. 2019. Neutral Lipids Are Not a Source of Arachidonic Acid for Lipid Mediator Signaling in Human Foamy Monocytes. *Cells*. 8(8):941.
- Guzmán-Agüero, J. E., M. Nieves-Soto, M. A. Hurtado, P. Piña-Valdez, M. C. Garza-Aguirre, M. 2013. Feeding physiology and scope for growth of the oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) acclimated to different conditions of temperature and salinity. *Aquacult. int.* 21(2):283-297.
- Hamdoun, A. M., 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(2):160-169.
- Hamel, L., M. Kenney, Z. Jayyosi, A. Ardati, K. Clark, A. Spada, A. Zilberstein, J. Perrone, J. Kaplow, L. Merkel, C. Rojas. 2000. Induction of heat shock protein 70 by herbimycin A and cyclopentenone prostaglandins in smooth muscle cells. *Cell stress chaperones*. 5(2):121-131.
- Harizi, H., J. B. Corcuff, N. Gualde. 2008. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends Mol med.*14(10): 461-469.
- Harney, E., S. Artigaud, P. Le Souchu, P. Miner, C. Corporeau, H. Essid, V. Pichereau, F. L. Nunes. 2016. Non-additive effects of ocean acidification in combination with warming on the larval proteome of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. of proteomics*. 135:151-161.
- Harris, J. 2008. Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). Aquatic Invasive Species Profile. *Aquatic Invasion Ecology*. 1-12.
- Heise, K., S. Puntarulo, H. O. Pörtner, D. Abele, 2003. Production of reactive oxygen species by isolated mitochondria of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* (King and Broderip) under heat stress. *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.* 134(1):79-90.
- Hurtado, M. A., I. S. Racotta, F. Arcos, E. Morales-Bojórquez, J. Moal, P. Soudant, E. Palacios. 2012. Seasonal variations of biochemical, pigment, fatty acid, and sterol compositions in female *Crassostrea corteziensis* oysters in relation to the

- reproductive cycle. *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.* 163(2):172-183.
- Hurtado, M. A., M. Reza, M. Ibarra, A. M. Wille, P. Sorgeloos, P. Soudant, E. Palacios 2009. Arachidonic acid (20:4n-6) effect on reproduction, immunology, and prostaglandin E2 levels in *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951). *Aquaculture*. 294(3-4): 300-305.
- Imbs, A. B., I. M. Yakovleva. 2012. Dynamics of lipid and fatty acid composition of shallow-water corals under thermal stress: an experimental approach. *Coral Reefs*. 31(1): 41-53.
- International Council for the Exploration of the Sea (ICES). 2009. Cooperative Research Report: Rapport Des Recherches Collectives. International Council for the Exploration of the Sea.
- Irinco-Salinas, R. 2012. Histopathology in the digestive gland of *Batissa violaceae* Lamark as a biomarker of pollution in the Catubig River, Northern Samar, Philippines. *IPCBE*. 49:20-24.
- Islas-Olivares, R. 1975. El ostión japonés (*Crassostrea gigas*) en Baja California. *Cienc. Mar.* 2(1):58-59.
- Islas-Olivares, R. 1982. Análisis Económico En El Cultivo Del Ostión Japonés (*Crassostrea gigas*) En Puerto Don Juan, Bahía De Los Ángeles, BC. *Cienc. Mar.* 8(2):55-68.
- Ivanina, A. V., C. Taylor, I. M. Sokolova. 2009. Effects of elevated temperature and cadmium exposure on stress protein response in eastern oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Aquat. Toxicol.* 91(3):245-254.
- Johnson, M. M., B. Vaughn, M. Triggiani, D. D. Swan, A. N. Fonteh, F. H. Chilton. 1999. Role of arachidonyl triglycerides within lipid bodies in eicosanoid formation by human polymorphonuclear cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 21(2):253-258.
- Kergel, K.C. 2002. Heat shock proteins: Modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol.* 92(5):2177-2186.
- Kim, B. M., K. Kim, I.Y. Choi, J. S. Rhee. 2017. Transcriptome response of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* susceptible to thermal stress: a comparison with the response of tolerant oyster. *Mol. Cell. Toxicol.* 13(1):105-113.

- Kim, J. H., S. Y. Jeong, P. J. Kim, H. U. Dahms, K. N. Han. 2017. Bio-effect-monitoring of long-term thermal wastes on the oyster, *Crassostrea gigas*, using heat shock proteins. *Mar pollut bull.* 119(1):359-364.
- Kim, M., I. Y. Ahn, J. Cheon, H. Park. 2009. Molecular cloning and thermal stress-induced expression of a pi-class glutathione S-transferase (GST) in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*. *Comp. Biochem. Physiol., Part A: Mol. Integr. Physiol.* 152(2):207-213.
- Kobayashi, Y., K. Wakamiya, M. Kohka, Y. Yamamoto, K. Okuda. 2013. Summer heat stress affects prostaglandin synthesis in the bovine oviduct. *Reproduction.* 146(2): 103-110.
- Koganezawa, A. 1974. Present status of studies on the mass mortality of cultured oyster in Japan and its prevention. *Proc. 3rd US-Japan Meet. Aquacult.* 1974. En: Samain, J. F., Degremont, L., Soletchnik, P., Haure, J., Bédier, E., Ropert, M., Delaporte, M, K. CostiliS, Pouvreaux C. Lambertk V. Boulog P. Soudantk J.L. Nicolas F. Le Roux T. Renault B. Gagnaire F. Gerethl. Boutetk T. Burgeoth P. Boudry. 2007. Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture.* 268(1-4): 227-243.
- Le Moullac, G., I. Quéau, P. Le Souchu, S. Pouvreau, J. Moal, J. René Le Coz, J. François-Samain. 2007. Metabolic adjustments in the oyster *Crassostrea gigas* according to oxygen level and temperature. *Mar. Biol. Res.* 3(5):357-366.
- Lebrero, P., A. M. Astudillo, J. M. Rubio, L. Fernández-Caballero, G. Kokotos, M. Balboa, M. A., J. Balsinde. 2019. Cellular plasmalogen content does not influence arachidonic acid levels or distribution in macrophages: A role for cytosolic phospholipase A2 γ in phospholipid remodeling. *Cells.* 8(8):799.
- Lewis, M., M. Götting, K. Anttila, M. Kanerva, J. M. Prokkola, E. Seppänen, I. Kolari, M. Nikinmaa. 2016. Different relationship between hsp70 mRNA and hsp70 levels in the heat shock response of two salmonids with dissimilar temperature preference. *Front. Physiol.* 7:511.

- Livak, K. J., T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4):402-408.
- Lordan R., A. Tsoupras, I. Zabetakis. 2017. Phospholipids of animal and marine origin: Structure, function, and anti-inflammatory properties. *Molecules*. 22(11):1964.
- Malham, S. K., E. Cotter, S. O'Keeffe, S. Lynch, S. C. Culloty, J.W King, J.W. Latchford, A.R. Beaumont. 2009. Summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in the Irish sea: the influence of temperature and nutrients on the health and survival. *Aquaculture*. 287:128-138.
- Manduzio, H., B. Rocher, F. Durand, C. Galap, F. Leboulenger. 2005. The point about oxidative stress in molluscs. *Invertebrate Surviv J.* 2(2): 91-104.
- Martínez G., L. Mettifogo, R. Lenoir, E. O. Campos. 2000. Prostaglandins and reproduction of the scallop *Argopecten purpuratus*: I. Relationship with gamete development. *J. Exp. Zool.* 284(2):225-231.
- Martínez, G., L. Mettifogo, R. Lenoir, A. Olivares. 2000. Prostaglandins and reproduction of the scallop *Argopecten purpuratus*: II. Relationship with gamete release. *J. Exp. Zool.* 287(1):86-91.
- Matés, J. M., C. Pérez-Gómez, I. N., de Castro, M., Asenjo, J. Márquez. 2002. Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death. *Int. J. Biochem. Cell. B.* 34(5):439-458.
- Matsutani T., y T. Nomura. 1987. In vitro effects of serotonin and prostaglandins on release of eggs from the ovary of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 67(1):111-118.
- Meistertzheim A. L., A. Tanguy, D. Moraga, M. T. Thébault. 2007. Identification of differentially expressed genes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to prolonged thermal stress. *The FEBS J.* 274(24):6392-6402.
- Miller, E., A. Morel, L. Saso, J. Saluk. 2014. Isoprostanes and neuroprostanes as biomarkers of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Oxid. Med. Cell. Longevity*. 2014:1-10.
- Milne, G. L., Q. Dai, L. J. Roberts II. 2015. The isoprostanes—25 years later. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids.* 1851(4):433-445.

- Mondal, S., A. Mor, I. J. Reddy, S. Nandi, P. P. Gupta. 2017. Heat stress induced alterations in prostaglandins, ionic and metabolic contents of sheep endometrial epithelial cells *in vitro*. Biomed. J Sci Tech. Res. 1:1-5.
- Morse, D. E., H. Duncan, N. Hooker, A. Morse. 1977. Hydrogen peroxide induces spawning in mollusks, with activation of prostaglandin endoperoxide synthetase. Science. 196(4287): 298-300.
- Morse, D. E., N. Hooker, A. Morse. 1978. Chemical control of reproduction in bivalve and gastropod molluscs, III: An inexpensive technique for mariculture of many species. En: Proceedings of the annual meeting-World Mariculture Society. 9(1-4): 543-547.
- Munro, P. E., J. H Bearu, E. Lacanienta. 1983. Investigations on the substance which causes sperm release in Tridacnid clams. Comp. Biochem. Physiol., C: Comp. Pharmacol. 74(1): 219-223.
- Navarro A., M. Faria, C. Barata, B. Piña. 2011. Transcriptional response of stress genes to metal exposure in zebra mussel larvae and adults. Environ. Pollut. 159(1): 100-107.
- Ochoa-Araiza, A. G., M. Fimbres-Peña. 1984. Evaluación de temperatura, salinidad y crecimiento del ostión japonés (*Crassostrea gigas*) en una laguna costera del estado de Sonora. Cienc. Mar. 10(3): 7-16.
- Odendaal J. P., A. J. Reinecke. 2003. Quantifying histopathological alterations in the hepatopancreas of the woodlouse *Porcellio laevis* (Isopoda) as a biomarker of cadmium exposure. Ecotoxicol. Environ. Saf. 56(2):319-325.
- Osada, M., T. Nomura. 1990. The levels of prostaglandins associated with the reproductive cycle of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. Prostaglandins. 40(3), 229-239.
- Palacios, E., I. S Racotta, O. Arjona, Y. Marty, J. R. Le Coz, J. Moal, J. F. Samain, 2007. Lipid composition of the pacific lion-paw scallop, *Nodipecten subnodosus*, in relation to gametogenesis: 2. Lipid classes and sterols. Aquaculture. 266(1-4):266-273.
- Palacios, E., I. S. Racotta, A. M. Ibarra, J. L. Ramírez, A. Millañ y S. Avila 2004. Comparison of biochemical composition and muscle hypertrophy associated with the reproductive cycle of diploid and triploid *Argopecten circularis* scallops. J. Shellfish Res. 23:483-489.

- Palacios, E., I. S. Racotta, B. Aparicio, O. Arjona, C. A. Martínez-Palacios. 2007. Lipid classes and fatty acids during embryogenesis of captive and wild silverside (*Chirostoma estor estor*) from Pátzcuaro Lake. *Fish. Physiol. Biochem.* 33(1):81-91.
- Paoletti, R., D. Kritchevsky. 2017. *Advance in lipid research*. Academic Press. Londres. 293p.
- Park M. S., P. G. Jo, Y. K. Choi, K. W. An, C. Y. Choi. 2009. Characterization and mRNA expression of Mn-SOD and physiological responses to stresses in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol. Res.* 5(5): 451-461.
- Patrick, S., N. Faury, P. Gouletquer. 2006. Seasonal changes in carbohydrate metabolism and its relationship with summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Marennes–Oléron bay (France). *Aquaculture.* 252(2-4):328-338.
- Piano, A., C. Asirelli, F. Caselli, E. Fabbri. 2002. Hsp70 expression in thermally stressed *Ostrea edulis*, a commercially important oyster in Europe. *Cell Stress Chaperones.* 7(3): 250-257.
- Pil, G. J., K. W. An, M. S. Park. C. Youngchoi. 2008. mRNA expression of HSP90 and SOD, and physiological responses to thermal and osmotic stress in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Molluscan Res.* 28(3):158-164.
- Power, A., D. Sheehan. 1996. Seasonal variation in the antioxidant defence systems of gill and digestive gland of the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Pharmacol., Toxicol. Endocrinol.* 114(2):99-103.
- Renault T., R. M. Le Deuff, B. Chollet, N. Cochenec, A. Gérard. 2000. Concomitant herpes-like virus infections in hatchery-reared larvae and nursery-cultured spat *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Dis. Aquat. Org.* 42(3):173-183.
- Renault, T. 2011. A review of mortality outbreaks in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, reported since 2008 in various European Union Member States and the related implementation of Council Directive 2006/88/EC. *OIE Bulletin*, 3:51-52.
- Richter, C., T. Viergutz, M. Schwerin, J. M. Weitzel. 2014. Prostaglandin E synthase interacts with inducible heat shock protein 70 after heat stress in bovine primary dermal fibroblast cells. *Cytometry Part A.* 87(1):61-67.

- Rico-Villa, B., S. Pouvreau, R. Robert. 2009. Influence of food density and temperature on ingestion, growth and settlement of Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Aquac.* 287(3-4): 395-401.
- Romero Geraldo, R. J. 2013. Estudio de la expresión diferencial de genes en el ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1973), como respuesta a la exposición a un dinoflagelado productor de toxinas marinas de tipo diarreico. Tesis (Doctor en Ciencias). México. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. 99 p.
- Ruggeri, B. A., C. A. Thoroughgood. 1985. The identification of several prostaglandin moieties in *Crassostrea virginica* and *Mytilus edulis* by radioimmunoassay and high performance liquid chromatography. *Prostaglandins, Leukotrienes Med.* 20(1):69-77.
- Ruggles, K. V., A. Turkish, S. L. Sturley. 2013. Making, baking, and breaking: the synthesis, storage, and hydrolysis of neutral lipids. *Annu. Rev. Nutr.* 33:413-451.
- Saintsing, D. G., D. H. Hwang, T. H. Dietz. 1983. Production of prostaglandins E2 and F2 alpha in the freshwater mussel *Ligumia subrostrata*: relation to sodium transport. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 226(2):455-461.
- Sakai, S., N. Hagihara M. Kuse, K. Kimura, K. Okuda. 2018. Heat stress affects prostaglandin synthesis in bovine endometrial cells. *J. Reprod. Dev.* 64: 311-317.
- Salgado-García, R.L. 2009. Efecto del ácido araquidónico (20:4n-6) sobre la capacidad reproductiva y el nivel de prostaglandina PGE2 del pez blanco de Pátzcuaro *Menidia estor*. (Tesis de Maestría). La Paz, B.C.S, México. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. 152p.
- Samain, J. F., L. Degremont, P. Soletchnik, J. Haure, E. Bédier, M., M. Ropert, J. Moal, A. Huvet, H. Bacca, A. Van Wormhoudt, M. Delaporte, K. Costil, S. Pouvreau, C. Lambert, V. Boulo, P. Soudant, J.L. Nicolas, F. Le Roux, T. Renault, B. Gagnaire, F. Geret, I. Boutet, T. Burgeot, P. Boudry, M. Delaporte. 2007. Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture.* 268(1-4): 227-243.

- Samain, J.F., H. McCombie. 2008. Summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas*: the Morest Project. Editions Quae. Primera edición. Francia. 400p.
- Sarà, G., C. Romano, J. Widdows, F. J. Staff. 2008. Effect of salinity and temperature on feeding physiology and scope for growth of an invasive species (*Brachidontes pharaonis-Mollusca: Bivalvia*) within the Mediterranean Sea. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 363(1-2): 130-136.
- Schierbeek, H., C. H. Van den Akker, L. B. Fay, J. B. Van Goudoever. 2012. High-precision mass spectrometric analysis using stable isotopes in studies of children. Mass. Spectrom. 31(2):312-330.
- Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2010. Anuario Estadístico de Pesca y Acuicultura.
- Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2015. Anuario Estadístico de Pesca y Acuicultura.
- Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2016. Anuario Estadístico de Pesca y Acuicultura.
- Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2012. Carta Nacional Acuícola, Diario Oficial (Segunda sección).
- Seebacher, F., W. Davison, C. J. Lowe, C. E. Franklin. 2005. A falsification of the thermal specialization paradigm: compensation for elevated temperatures in Antarctic fishes. Biol. Lett. 1(2):151-154.
- Seguineau, C., I. S. Racotta, E. Palacios, M. Delaporte, J. Moal, P. Soudant. 2011. The influence of dietary supplementation of arachidonic acid on prostaglandin production and oxidative stress in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Comp. Biochem. Physiol., Part A: Mol. Integr. Physiol. 160(1):87-93.
- Selvakumar, S., y P. Geraldine. 2003. Thermal modulation of pyruvate metabolism in the freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsoni*: the role of lactate dehydrogenase. Fish Physiol Biochem. 29(2), 149-157.
- Shah, N.G., M.E. Tulapurkar, I.S. Singh, J.H. Shelhamer, M.J. Cowan, J.D. Hasday. 2010. Prostaglandin E₂ potentiates heat shock-induced heat shock protein 72 expression in A549 cells. Prostaglandins other lipid mediators. 93(1-2):1-7.

- Simmons, D. L., R. M. Botting, T. Hla. 2004. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol. Rev.* 56(3): 387-437.
- Snyder, M. J., E. Girvetz, E. P. Mulder. 2001. Induction of marine mollusc stress proteins by chemical or physical stress. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41(1): 22-29.
- Snyder, R. J., W. D. Schregel, Y. Wei. 2012. Effects of thermal acclimation on tissue fatty acid composition of freshwater alewives (*Alosa pseudoharengus*). *Fish. Physiol. Biochem.* 38(2):363-373.
- Soletchnik, P., C. Lambert, K. Costil. 2005. Summer mortality of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in relation to environmental rearing conditions. *J. Shellfish Res.* 24(1): 197-207.
- Soletchnik, P., M. Ropert, J. Mazurié, P.G. Fleury, F. Le Coz. 2007. Relationships between oyster mortality patterns and environmental data from monitoring databases along the coasts of France. *Aquaculture.* 271(1-4): 384-400.
- Soletchnik, P., N. Faury, P. Gouletquer. 2005. Seasonal changes in carbohydrate metabolism and its relationship with summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Marennes–Oléron bay (France). *Aquaculture.* 252(2-4): 328-338.
- Solomieu, V. B., T. Renault, M. A. Travers. 2015. Mass mortality in bivalves and the intricate case of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Invertebr. Pathol.* 131: 2-10.
- Solovchenko, A. E. 2012. Physiological role of neutral lipid accumulation in eukaryotic microalgae under stresses. *Russ. J. Plant Physiol.* 59(2): 167-176.
- Sørensen, J. G., T. N. Kristensen, V. Loeschcke. 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecol.* 6(11): 1025-1037.
- Srinivasan, S., N. G. Avadhani. 2012. Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress. *Free Radicals Biol. Med.* 53(6): 1252-1263.
- Sun, H., R. Jiang, S. Xu, Z. Zhang, G. Xu, J. Zheng, L. Qu. 2015. Transcriptome responses to heat stress in hypothalamus of a meat-type chicken. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 6(1): 6.
- Tanguy, A., I. Boutet, D. Moraga. 2005. Molecular characterization of the glutamine synthetase gene in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: expression study in

response to xenobiotic exposure and developmental stage. *Biochim. Biophys. Acta, Gene Struct. Expression.* 1681(2-3):116-125.

- 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 J.* 272(2): 390-403.
- Tapia-Vázquez, O., González-Alcalá, H. M., Sáenz-Gaxiola, L. M., García-Hirales, R. 2008. Manual de buenas prácticas en granjas ostrícolas de San Quintín, Baja California, México. Comité Estatal de Sanidad Acuícola e Inocuidad de Baja California A.C. SAGARPA-CONAPESCA.
- Tate, S., F. Y. Leu, A. Meister, 1972. Rat liver glutamine synthetase preparation, properties, and mechanism of inhibition by carbamyl phosphate. *J. Biol. Chem.* 247(17):5312-5321.
- Tokuda, H., O. Kozawa, M. Niwa, H. Matsuno, K. Kato, T. Uematsu. 2002. Mechanism of prostaglandin E2-stimulated heat shock protein 27 induction in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *J. Endocrinol.* 172(2): 271-282.
- Tomanek, L., y G. N. Somero. 1999. Evolutionary and acclimation-induced variation in the heat-shock responses of congeneric marine snails (genus *Tegula*) from different thermal habitats: implications for limits of thermotolerance and biogeography. *J. Exp. Biol.* 202(21): 2925-2936.
- Truzzi, C., S. Illuminati, M. Antonucci, G. Scarponi, A. Annibaldi. 2018. Heat shock influences the fatty acid composition of the muscle of the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*. *Mar. Environ. Res.* 139: 122-128.
- Tsai, A. L., R. J. Kulmacz. 2010. Prostaglandin H synthase: resolved and unresolved mechanistic issues. *Arch. Biochem. Biophys.* 493(1): 103-124.
- Tsigos, C., I. Kyrou, E. Kassi, G. P. Chrousos. 2016. Stress, Endocrine Physiology and Pathophysiology. En: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDTText.com, Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278995/>.
- Valera-Alberni, M., C. Canto. 2018. Mitochondrial stress management: a dynamic journey. *CES.* 2(10):253.

- Vásquez-Yeomans, R., J. Cáceres Martínez, A. M. García Ortega. 2004. Bacterias aisladas de las branquias del ostión japonés *Crassostrea gigas* cultivado en Bahía Falsa, Baja California, México. An. Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. Méx., Ser. Zool., 75(2):237-242.
- Velez, C., E. Figueira, A. M. Soares, R. Freitas, 2016. Effects of seawater temperature increase on economically relevant native and introduced clam species. Mar. Environ. Res. 123: 62-70.
- Vogt, S., I. Portig, M. Irqsusi, V. Ruppert, P. Weber, R. Ramzan. 2011. Heat shock protein expression and change of cytochrome c oxidase activity: presence of two phylogenetic old systems to protect tissues in ischemia and reperfusion. J. Bioenerg. Biomembr. 43(4):425-435.
- Wang, D., R. N. DuBois. 2010. Eicosanoids and cancer. Nat Rev Cancer. 10(3): 181.
- Whiteley, N. M., C. L. Mackenzie. 2016. Physiological responses of marine invertebrates to thermal stress. En: Solan M., N.M. Whiteley (eds) Stressors in the marine environment. Oxford University Press, Oxford, pp 56–72.
- Yang, C. Y., M. T. Sierp, C. A. Abbott, Y. Li, J. G. Qin. 2016. Responses to thermal and salinity stress in wild and farmed Pacific oysters *Crassostrea gigas*. Comp. Biochem. Physiol., Part A: Mol. Integr. Physiol. 201: 22-29.
- Zhang, H., H. Wang, H. Chen, M. Wang, Z. Zhou, L. Qiu, L. Wang., L. Song. 2019. The transcriptional response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* under simultaneous bacterial and heat stresses. Dev. Comp. Immunol. 94:1-10.
- Zhang, Z., Q. Zhang. 2012. Molecular cloning, characterization and expression of heat shock protein 70 gene from the oyster *Crassostrea hongkongensis* responding to thermal stress and exposure of Cu²⁺ and malachite green. Gene. 497(2): 172-180.
- Zhao, R. Z., S. Jiang, L. Zhang, Z. B. Yu. 2019. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling. Int. J. Mol. Med. 44(1): 3-15.
- Zheng, L., M. Fleith, F. Giuffrida, B. V. O'Neill, N. Schneider. 2019. Dietary Polar Lipids and Cognitive Development: A Narrative (Review). Adv. Nutr. 10(6): 1163-1176.