



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS TÉRMICO REGULADOS POR
METILACIÓN EN EL OSTIÓN DEL PACÍFICO *Crassostrea gigas*.

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

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

P r e s e n t a

Roberto Carlos Arredondo Espinoza

La Paz, Baja California Sur, octubre de 2021.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 13:22 horas del día 7 del Mes de Septiembre del 2021, 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:

"Genes de respuesta a estrés térmico regulados por metilación en el ostión del Pacífico *Crassostrea gigas*"

Presentada por el alumno:

Roberto Carlos Arredondo Espinoza

Aspirante al Grado de DOCTOR 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



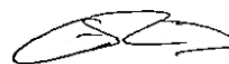
Dr. Ana María Ibarra Humphries
Co-Director de Tesis



Dr. Cristina Escobedo Fregoso
Co-Director de Tesis



Dr. María Teresa Sicard González
Co-Tutor



Dr. Alberto Peña Rodríguez
Co-Tutor



Dr. Steven B. Roberts
Co-Tutor



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

La Paz, Baja California Sur, a 07 de septiembre de 2021.

Los miembros del comité de tesis del (la) estudiante Roberto Carlos Arredondo Espinoza del Programa de Doctorado en Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el VoBo dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio:
iThenticate
- Filtros utilizados:
Excluir bibliografía
- Porcentajes de similitud:
13%
Se muestra captura de pantalla

Tesis_Roberto_Arredondo

INFORME DE ORIGINALIDAD

13%
INDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	Arredondo-Espinoza Roberto, Ibarra Ana M., Roberts B. Steven, Sicard-Gonzalez Maria Teresa, Escobedo-Fregoso Cristina, "Differentially methylated gene regions between resistant and susceptible heat-phenotypes of the Pacific oyster <i>Crassostrea gigas</i> ". Aquaculture, 2021	428 palabras — 2%
2	wellcomeopenresearch.s3.amazonaws.com	245 palabras — 1%
3	egob.biomedicine.gu.se	182 palabras — 1%
4	snapshot.geneontology.org	178 palabras — 1%
5	hdl.handle.net	174 palabras — 1%
6	woldiab.caltech.edu	145 palabras — 1%
7	archimer.ifremer.fr	74 palabras — < 1%
8	www.pure.ed.ac.uk	71 palabras — < 1%

Firmas del comité



Dra. Ana María Ibarra Humphries



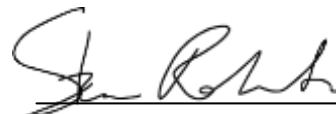
Dra. Cristina Escobedo Fregoso



Dra. Ma. Teresa Sicard Gonzalez



Dr. Alberto Peña Rodríguez



Dr. Steven B. Roberts

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dra. Ana María Ibarra Humphries
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Directora de Tesis

Dra. Cristina Escobedo Fregoso
Cátedras CONACyT
Co-Directora de Tesis

Dra. María Teresa Sicard González
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Tutora de Tesis

Dr. Alberto Peña Rodríguez
Cátedras CONACyT
Co-Tutor de Tesis

Dr. Steven B. Roberts
University of Washington, Seattle WA
Co-Tutor de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dra. Ana María Ibarra Humphries
Dra. Cristina Escobedo Fregoso
Dra. María Teresa Sicard González
Dr. Alberto Peña Rodríguez
Dr. Steven B. Roberts

Jurado de Examen

Dra. Ana María Ibarra Humphries
Dra. Cristina Escobedo Fregoso
Dra. María Teresa Sicard González
Dr. Alberto Peña Rodríguez
Dr. Steven B. Roberts

Suplentes

Dr. Pedro Cruz Hernández
Dr. Pedro Enrique Saucedo Lastra

Resumen

Desde la introducción del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* en Baja California Sur, México, su cultivo ha enfrentado retos ambientales específicamente con el aumento de temperatura, produciendo altas mortalidades. El cambio en el medio ambiente relacionado a la temperatura durante un año en la Península de Baja California oscila entre los 7°C y los 39°C. En esta área, el estrés por calor es uno de los factores que afectan la producción del ostión del Pacífico, por lo cual se requieren investigaciones destinadas a mejorar la tolerancia al aumento de temperatura. Por esta razón, se está implementando el cultivo de *C. gigas*, para mejoramiento genético, donde se han caracterizado las líneas de cría disponibles con 50 familias. Dada su tolerancia al calor, se seleccionaron las dos más termo-resistentes y las dos más termo-susceptibles. Asimismo, con base en monitoreo de lugares de cultivo como la Laguna San Ignacio B.C.S., las familias fueron expuestas a un reto térmico oscilatorio (26°C - 34°C) durante 30 días. Se tomaron muestras de tejido de branquia con el objetivo de analizar las diferencias en la expresión génica y la metilación del ADN entre los fenotipos resistentes y susceptibles. La expresión génica reveló 1,182 transcritos sobre-regulados y 2,002 sub-regulados en el día 0 y 2,660 genes sobre-regulados y 2,172 sub-regulados en el día 30. Los genes sobre-regulados se relacionaron con procesos celulares, la actividad de unión y partes de la membrana. Además, se observaron 170 transcritos expresadas diferencialmente en termo-resistentes y 170 en termo-susceptibles conservados durante el reto térmico. Estos transcritos se sugirieron como transcritos marcadores para la diferenciación entre fenotipos.

En el análisis de metilación del ADN, no se encontraron diferencias en la metilación global entre los fenotipos. Sin embargo, se encontraron regiones metiladas diferencialmente (DMR) entre los fenotipos, lo que sugiere que la temperatura modifica la metilación en regiones génicas de *C. gigas*, donde los termo-resistentes mostraron más genes con hiper-DMR en intrones (122), seguidos de exones (23) y promotores (2), mientras que las regiones hipometiladas correspondían a diez en intrones, tres en exones y uno en promotor. Los DMR hipermetilados se encontraron principalmente en genes asociados con procesos como la regulación de la expresión génica, interacción de iones, metabolismo y la producción de componentes celulares. Por otra parte, la comparación de la expresión génica y las regiones de metilación identificadas, no presentó una correlación entre los resultados de la expresión génica y los hiper-DMR. Sin embargo, dos DMR exónicos y siete intrónicos se relacionaron con la expresión de isoformas que se diferencian entre fenotipos y esto complementa la información de marcadores de metilación y transcripción. Con este resultado, este se convierte en el primer informe de transcritos marcadores basados en perfiles transcriptómicos complementados con DMR para la identificación de fenotipos para la futura selección de reproductores.

Palabras clave: Treanscriptómica, Epigenética, expresión diferencial, metilación de ADN, fenotipos térmicos, acuicultura.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1607-7534>

Vo.Bo. Co-Directoradas de Tesis

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Ana María Ibarra Humphries". The signature is fluid and cursive, with the first name "Ana" and last name "Humphries" being more prominent.

Dra. Ana María Ibarra Humphries

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Cristina Escobedo Fregoso". The signature is more compact and stylized than the one on the left.

Dra. Cristina Escobedo Fregoso

Summary

Since the introduction of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Baja California Sur, Mexico, its culture has faced environmental challenges specifically with increasing of temperatures producing high mortalities. The environmental criteria about temperature during a year in the Baja California Peninsula oscillates from 7°C to 39°C. In this area, heat stress is one of the factors that affect production of the Pacific oyster and research aiming to improve heat tolerance is required. For this reason, *C. gigas* breeding stock, produced for genetic improvement, has been implemented, and breeding lines available with 50 families were characterized for their heat-tolerance, selecting the two-most heat-resistant and the two-most heat-susceptible families. Based on culture place observations as San Ignacio Lagoon B.C.S., the families were exposed to an oscillatory thermal challenge (26-34°C) during 30 days. Gill tissue was sampled and aimed for analyzing for differences in gene expression and DNA methylation among heat-resistant and heat-susceptible phenotypes. Gene expression revealed 1,182 up and 2,002 down regulated transcripts at day 0 and 2,660 up and 2,172 down regulated genes at day 30. The up regulated genes involved in cellular processes, binding activity and parts of membrane were mostly present. Additionally, in RR there were 170 differential expressed transcripts in thermal-resistants and 170 in thermal-susceptible conserved during the thermal challenge. These transcripts were suggested as transcript markers for phenotype differentiation.

In DNA methylation differences were found in global methylation among heat-phenotypes, differentially methylated regions (DMRs) were found among phenotypes, suggesting that temperature modifies the methylation in gene bodies of *C. gigas*, where the heat-resistants showed more genes with hyper-methylated DMRs in introns (122), followed by exons (23), and promoters (2), whereas hypo-methylated regions corresponded to ten in introns, three in exons, and one in promoters. Hyper-methylated DMRs were mostly found in genes associated with processes such as regulation of gene expression, ions interactions, metabolism, and production of cellular components. In other instance, the comparison of gene expression and methylation reports did not present a correlation between gene expression results and DMRs. Nevertheless, two exonic and seven intronic DMR were related to the expression in different isoforms that are differentiated among phenotypes and this complements the information of methylation and transcript markers. With this result, this becomes the first report of transcript markers based on transcriptomic profiles complemented with DMRs to identify RR phenotype for future broodstock selection.

Keywords: Transcriptomic, Epigenetic, Differential expression, DNA methylation, thermal-phenotypes, aquaculture.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1607-7534>

Vo.Bo. Co-Directoradas de Tesis



Dra. Ana María Ibarra Humphries



Dra. Cristina Escobedo Fregoso

Dedicatoria

A mi familia, que a pesar de la distancia, siempre están presentes.

A la memoria de la Dra. Enriqueta Muñoz, que hasta el cielo le seré siempre agradecido por sus consejos contundentes que no se olvidan.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento del proyecto con clave SEP-CONACYT-CB-2015-255408 para CEF.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el otorgamiento de la beca (con número de becario 281987) que permitió llevar a cabo los gastos de manutención durante el periodo de desarrollo del Doctorado.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. por el otorgamiento del apoyo de beca de apoyo parcial para gastos de manutención para finalizar Doctorado.

Al Posgrado de CIBNOR por todas las facilidades prestadas durante el Doctorado, gracias a todo el personal.

A mis Co-Directoras de Tesis Dra. Ana María Ibarra y Dra. Cristina Escobedo por su apoyo y asesoría durante el desarrollo del proyecto.

A mis Co-Tutores: Dr. Alberto Peña, Dra. Ma. Teresa Sicard y Dr. Steven Roberts, quienes brindaron buenas aportaciones y mejores consejos para mejorar la calidad del trabajo.

A los Técnicos José Luis Ramírez Arce por su orientación en la producción de ostión, Susana Ávila Álvarez, Gabriel González Gómez del Laboratorio de Genética Acuícola, Rosa Isela Vázquez Sánchez del Laboratorio de Ecofisiología, Gilberto González Soriano, por su apoyo en el funcionamiento de los sistemas de control térmico y Gabriela Mendoza Carrión del Laboratorio de Genómica y Bioinformática por su apoyo durante el desarrollo de experimentos y en Laboratorio.

A mis Padres y familia que me han empujado a salir adelante, sin olvidar el sitio de origen.

A mis amigos que me acompañaron dentro y fuera del Posgrado, desde los Toucheros-Ardilla hasta los Laboratorios de Producción de Ostiones.

A mis amigos Tomas, Cris y Chava, Zoe y Martine, con quien siempre conté para una buena platica.

A Cristina Escobedo, de quien no olvidare que, en los momentos más difíciles, siempre me brindó su apoyo incondicional.

Contenido

Resumen	i
Summary	iii
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vi
Contenido	vii
Listado de figuras	ix
Listado de tablas	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Generalidades del ostión japonés <i>Crassostrea gigas</i>	4
2.2 Genes de respuesta a estrés térmico	5
2.3 Regulación de la expresión génica por metilación	7
2.4 Modificación de los patrones de metilación	10
3. JUSTIFICACIÓN	11
4. HIPÓTESIS	12
5. OBJETIVOS	13
5.1 Objetivo general	13
5.2 Objetivos particulares	13
6. MATERIAL Y METODOS	14
6.1 Organismos de estudio.....	14
6.2 Genotipificación de las familias termo-resistentes y termo-susceptibles	15
6.2.1 Extracción de ADN	15
6.2.2 Determinación de integridad del ADN mediante PCR punto final	16
6.2.3 Estandarización de amplificación de microsatélites	16
6.2.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida	17
6.2.5 Análisis de parentesco.....	18
6.3 Análisis transcriptómico	19
6.3.1 Secuenciación ARN-Seq.....	19
6.3.2 Análisis bioinformático.....	20
6.3.3 Análisis de expresión diferencial	20
6.3.4 Anotación del transcriptoma.....	21
6.3.5 Análisis de enriquecimiento ontológico	21
6.4 Análisis de metilación entre fenotipos termo-resistentes y termo-susceptibles	21
6.4.1 Procesamiento de secuencias de WGBS	22
6.4.2 Extracción de regiones metiladas entre familias termo-resistentes y termo-susceptibles	22
6.4.3 Análisis de enriquecimiento ontológico de DMR identificadas entre fenotipos.....	23
6.5 Ontologías de genes expresados diferencialmente entre fenotipos con regiones (DMR) hiper o hipometiladas en promotores, exones e intrones	23
7. RESULTADOS	24
7.1 Evaluación de familias termo-resistentes y termo-susceptibles.....	24
7.2 Genotipificación de las familias termo-resistentes y termo-susceptibles	24
7.3 Estandarización de amplificación de microsatélites	25
7.4 Análisis de parentesco para muestras del día cero	26
7.5 Análisis de parentesco de muestras correspondientes al día 30	30
7.6 Análisis transcriptómico entre familias termo-resistentes y termo-susceptibles.....	32
7.7 Secuenciación RNA-Seq.....	34

7.8	Análisis de réplicas biológicas y expresión diferencial	35
7.9	Anotación de transcritos expresados diferencialmente	37
7.9.1	Regiones diferencialmente metiladas (DMR) entre fenotipos termo-resistente y termo-susceptible de <i>C. gigas</i>	48
7.9.2	DMR hiper e hipometiladas en promotores de genes de familias con fenotipo termo-resistente	49
7.9.3	Exones con DMR hiper o hipometiladas en ostiones del fenotipo termo-resistente	49
7.9.4	Intrones con DMR hiper o hipometiladas en ostiones del fenotipo termo-resistente	51
7.9.5	DMR hipermetiladas en múltiples regiones de un gen en ostiones del fenotipo termo-resistente.....	56
7.10	Transcritos expresados diferencialmente con DMR entre fenotipos	57
8.	DISCUSIÓN	62
8.1	Análisis de parentesco con microsatélites	62
8.2	Análisis transcriptómico	62
8.3	Genes expresados diferencialmente durante el reto térmico entre fenotipos	63
8.3.1	Transcritos asociados al fenotipo como marcadores de diferenciación	64
8.4	Metilación global entre fenotipos térmicos de <i>C. gigas</i>	66
8.5	Análisis de DMR entre fenotipos térmicos.....	67
8.5.1	DMR en promotores entre fenotipos térmicos de <i>C. gigas</i>	68
8.5.2	DMR exónicas e intrónicas en fenotipos térmicos de <i>C. gigas</i>	69
8.5.3	Múltiples hiper o hipo-DMR en <i>C. gigas</i> entre fenotipos térmicos.....	72
8.5.4	Genes expresados diferencialmente entre fenotipos con DMR en intrones y exones.....	73
9.	CONCLUSIONES	77
10.	LITERATURA CITADA	79
11.	ANEXOS	87
	Anexo A.- Artículo Publicado: Differentially methylated gene regions between resistant and susceptible heat-phenotypes of the Pacific oyster <i>Crassostrea gigas</i>	87
	Anexo B.- Artículo Sometido: Gene expression during a thermal challenge in thermal-tolerant phenotypes of the Pacific oyster <i>Crassostrea gigas</i> families.....	96

Listado de figuras

Figura 1. Modelo de activación de la regulación transcripcional para la síntesis de las proteínas HSP's (28).	5
Figura 2. Comparación de los niveles de expresión de HSP's entre familias de <i>C. gigas</i> con alta y baja supervivencia (5).	6
Figura 3. Esquema de metilación y regulación de la expresión de un gen. Las metilaciones (amarillo) se presentan dentro y fuera de las regiones codificantes (cajas azules). A: corresponde a un gen cuya expresión no está siendo regulada por metilación; B: regulación (31).....	7
Figura 4. Esquema de metilación y regulación de la expresión de un gen. Las metilaciones (amarillo) se presentan dentro y fuera de las regiones codificantes (cajas azules). A: corresponde a un gen cuya expresión no está siendo regulada por metilación; B: regulación (33).....	9
Figura 5. Reto térmico crónico con oscilaciones de temperatura basadas registros de campo.	15
Figura 6. Amplificación del gen β -actina utilizando el ADN extraído de los padres. E: Marcador de tamaño Low DNA Mass Ladder (INVITROGEN™); M: Macho; H: Hembra; L2.13.05, 30, 32, 35, 52 y 59; C-: control negativo; C+: control positivo; T: familia termo-resistente y S: familia termo-susceptible.	25
Figura 7. ARN en geles de agarosa de las muestras 1-36.....	32
Figura 8. Análisis RIN de muestras de ARN. A: Gráfico de intensidad basado en ARN 18S; B: Electroforesis de microfluidos.....	34
Figura 9. Calidad de lecturas (Q) en 100 pb	34
Figura 10. Análisis de componentes principales de las librerías de las seis familias muestreadas en el día cero y 30 días de exposición térmica	35
Figura 11. Mapa de calor (heat map) basado en los perfiles de expresión diferencial por réplica. Recuadro rojo: familia 52 y 59 termo-resistentes; recuadro azul: familia 05 y 35 termo-susceptibles	36
Figura 12. Número de transcritos sobre-regulados y sub-regulados entre fenotipos al día cero y al día 30	37
Figura 13. Enriquecimiento e interacción ontológica de los transcritos sobre-regulados entre fenotipos termo-resistente y termo-susceptible al día cero. A: Función molecular; B: Componente celular; C: Proceso biológico. El grosor de las flechas indica el nivel de interacción.....	38
Figura 14. Enriquecimiento e interacción ontológica de los transcritos sub-regulados entre fenotipos termo-resistente y termo-susceptible al día cero. A: Función molecular; B: Componente celular; C: Proceso biológico. El grosor de las flechas indica el nivel de interacción.....	39
Figura 15. Enriquecimiento e interacción ontológica de los transcritos sobre-regulados entre fenotipos termo-resistente y termo-susceptible al día 30	40
Figura 16. Ontología de transcritos sub-regulados entre fenotipos termo-resistente y termo-susceptible al día 30. A: Función molecular; B: Componente celular; C: Proceso biológico. El grosor de las flechas indica el nivel de interacción.	40
Figura 17. Transcritos sobre-regulados (Up) y sub-regulados (Down) diferencialmente expresados (sobre-regulados = FC > 2 y sub-regulados = FC < -2) entre fenotipos al día cero y 30 del reto térmico oscilatorio.....	41
Figura 18. Transcritos sobre-regulados (Up) y sub-regulados (Down) diferencialmente expresados (sobre-regulados = FC > 4 y sub-regulados = FC < -4) entre fenotipos al día cero y 30 del reto térmico oscilatorio.....	42
Figura 19. Caracterización de ontología de genes del total de DMR hipermetiladas y comparadas entre fenotipo.....	49
Figura 20. Ontología de genes que presentan DMR hipermetilado en ostiones de fenotipo termo-resistente.....	51

Figura 21. Categorías ontológicas del total de DMR hipermetiladas en regiones intrónicas en el fenotipo termo-resistente de <i>C. gigas</i>	55
Figura 22. Ontología de genes con múltiples DMR hipermetiladas en un mismo gen en el fenotipo termo-resistente	57
Figura 23. Transcritos sobre y sub-expresados diferencialmente comparados con DMR hiper e hipometilados.....	58
Figura 24. Posición de hipermetilación en el exón #1 del gen MAGUK p55 subfamily member 5 diferenciada entre familias termo-resistentes (R52 y R59) y termo-susceptibles (S05 y S35)	60
Figura 25. Niveles de expresión de las isoformas gen MAGUK p55 subfamily member 5 entre familias termo-resistentes (R52 y R59) y termo-susceptibles (S05 y S35) y posicionamiento de hipermetilación en el exón #1 (línea roja).....	61

Listado de tablas

Tabla I. Listado de primers para amplificar los microsatélites para el análisis de parentesco.....	17
Tabla II. Horas medias en morir para selección de fenotipos.....	24
Tabla III. Temperatura para amplificar los microsatélites	26
Tabla IV. Análisis de parentesco de las progenies para las cuales se obtuvo el transcriptoma antes y después de un reto térmico oscilatorio de 30 días	27
Tabla V. Concentración de ARN de las muestras	33
Tabla VI. Estadísticas de ensamble del transcriptoma con StringTie.....	35
Tabla VII. Anotación de transcritos marcadores para fenotipo termo-resistente.	43
Tabla VIII. Anotación de transcritos marcadores para fenotipo termo-susceptible	45
Tabla IX. Reporte de alineamiento y porcentajes de metilación global en las réplicas de las familias termo-resistentes y termo-susceptibles	47
Tabla X. Porcentajes promedio de metilación en CpG por familia dentro de fenotipo	48
Tabla XI. Número de regiones hiper e hipo-metilaciones diferenciales entre fenotipos de <i>C. gigas</i>	48
Tabla XII. Ontología de genes hiper e hipometilados en exones de <i>C. gigas</i> termo-resistentes.....	50
Tabla XIII. Anotación y ontología de los DMR hipermetilados con procesos de unión en intrones del fenotipo termo-resistente de <i>C. gigas</i>	52
Tabla XIV. Anotación y ontología de los DMR hipermetilados con función en componente celular en intrones del fenotipo termo-resistente de <i>C. gigas</i>	53
Tabla XV. Anotación y ontología de los DMR hipermetilados en intrones con varias funciones presentes en el fenotipo termo-resistente de <i>C. gigas</i>	54
Tabla XVI. Anotación y ontología de los intrones con DMR hipometiladas en el fenotipo termo-resistente de <i>C. gigas</i>	56
Tabla XVII. DMR hipermetiladas en exones e intrones en un mismo gen.....	56
Tabla XVIII. Transcritos sobre y sub-regulados que presentaron DMR	59

1. INTRODUCCIÓN

El ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* es originario de las costas de Japón, y ha sido introducido a países como Francia, Estados Unidos, Ecuador, México, entre otros. Por esta razón, el cultivo de *C. gigas* en diversas regiones en el mundo, lo ha convertido en un organismo modelo de investigación, incluyendo estudios sobre perfiles transcriptómicos, análisis epigenéticos y mejoramiento genético. En el caso de México, su cultivo ha tomado importancia desde su introducción a principios de los años 70 en el estado de Baja California, extendiéndose hacia los estados de Sonora y Baja California Sur a principios de los 80s (1). Sin embargo, el cultivo de este organismo se ha convertido en un reto, debido a que se presentan diferentes temperaturas en función a los sitios de cultivo en el noroeste de México, donde en la zona litoral intermareal (2) se exponen a retos de anoxia, estrés osmótico, y a fluctuaciones térmicas, especialmente en la región de la Laguna San Ignacio, Baja California Sur (26°54'00''N 113°13'00''W). Monitoreos de temperatura en la Laguna San Ignacio, han establecido rangos de que van desde 7°C a 39°C (3). Así mismo, bajo estas condiciones, se ha observado que estos organismos resisten a estos eventos, mediante la habilidad para contrarrestar estos cambios en el ambiente por una respuesta fisiológica inducida a partir de la modulación de la expresión de genes, con el fin de mantener la homeostasis (3). Estudiar la resistencia a estrés térmico en el pie de cría conformado para implementar un programa de mejoramiento genético en colaboración entre el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) y la empresa Sol Azul (<https://www.solazul.com.mx/eng/>) es uno de los objetivos principales dentro del programa y está en función de la identificación de fenotipos familiares termo-resistentes y termo-susceptibles al aumento de temperatura. Esta identificación fenotípica ha permitido elucidar diferencias entre estos grupos, como ha ocurrido en trabajos donde se observa diferencias en expresión de genes relacionados al aumento de temperatura (4), perfiles transcriptómicos (5–9), regulación hipoosmótica (10), respuesta inmune (11–13) y metabolismo (14). Por esta razón es importante considerar la plasticidad fenotípica de ostiones termo-resistentes y termo-susceptibles, donde estos organismos dependen de su capacidad de mantener la homeostasis en respuesta inmediata a dichos cambios ambientales (15).

Por otra parte, la resistencia a cambios ambientales puede reflejarse transgeneracionalmente, mediante la transmisión de información de padres a hijos mediante el genoma y epigenoma. La forma de transferir la información en el epigenoma se basa en la metilación del ADN, que es uno de los mecanismos epigenéticos que influyen en la regulación génica. Esto a su vez puede conferir ventajas transgeneracionales mediante la incorporación de grupos metilo en las secuencias de genes específicos que presentan una cantidad elevada de G+C, organizadas en pequeñas islas de CpG (16).

Los patrones de metilación pueden modificarse por diferentes disruptores abióticos, como son la exposición a contaminantes, temperatura, salinidad, sequía o por carencia de nutrientes en la dieta, ocasionando susceptibilidad a enfermedades y promoviendo baja capacidad de enfrentar condiciones ambientales desfavorables (2).

En *C. gigas*, se han identificado relaciones entre la expresión y los patrones de metilación de genes con funciones de mantenimiento. Estos genes presentan mayor metilación que los genes involucrados en funciones inducibles, como los involucrados en la respuesta a cambios ambientales, desarrollo embrionario o funciones tejido específico (17,18). Los patrones diferenciales de metilación tienen un papel crítico durante la embriogénesis, ya que es donde se llevan a cabo la mayor parte de las regulaciones epigenéticas (19).

Debido a que el cultivo de *C. gigas* en Baja California Sur, se realiza en sitios en donde se presentan temperaturas elevadas, el presente estudio se enfocó en identificar regulaciones epigenéticas que puedan proponerse como marcadores predictivos de la resistencia a altas temperaturas, tal como se han identificado en otros organismos como ratones, donde la mutación del gen *Agouti* causada por metilación, es predictivo de obesidad (20). En humanos, los marcadores de metilación son aplicados para el diagnóstico temprano de enfermedades como diabetes y cáncer en donde la desregulación o hipermetilación en promotores específicos generan diferencias en la proporción de metilación entre individuos sanos y enfermos (21). En ganado vacuno se puede predecir el marmoleado de la piel, y en plantas se ha estudiado la

metilación para realizar la selección de organismos resistentes a temperatura mediante sus patrones de metilación, sugiriendo que los cambios epigenéticos heredados aumentan la capacidad de regular de manera óptima el estrés por temperatura (22).

En este trabajo se abordó la comparación entre ostiones *C. gigas* resistentes y susceptibles al aumento de temperatura, identificando las diferencias desde el punto de vista transcriptómico y epigenético.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades del ostión japonés *Crassostrea gigas*

El hábitat del ostión japonés posee la característica de ser estuarino, prefiere aquellos sustratos firmes del fondo, y por su naturaleza sedentaria viven adheridos a las rocas, desechos y conchas. Su distribución comprende desde la zona intermareal hasta profundidades de 40 m. Habita en salinidades de 20 a 25 ups (unidades prácticas de salinidad), y se ha observado que su crecimiento es menor en salinidades de 10 ups, así como cuando son superiores a 35 ups. Sin embargo, estos rangos son diferentes en las costas de México. Por ejemplo, en la zona de cultivo comercial de la laguna San Ignacio en B.C.S, se han registrado salinidades promedio de 37 ups.

En el medio marino existen grandes fluctuaciones de temperatura que inducen a cambios fisiológicos en los organismos ectotermos a partir de un ajuste molecular al expresar genes como respuesta al estrés (23). El ostión japonés también es altamente tolerante a un amplio rango de temperaturas que va desde 1.8 a 35°C. En diferentes familias de ostiones *C. gigas*, se han obtenido grupos de organismos resistentes y susceptibles al aumento de temperatura, sugiriendo que la baja supervivencia de aquellas familias susceptibles puede ser el resultado de una interacción compleja de daño celular por infecciones oportunistas o agotamiento metabólico (24).

El efecto que desencadena un aumento de temperatura está asociado a oportunismo, como en el caso de las mortalidades de verano, en donde se ha propuesto que la interacción de los factores como: temperatura, oxígeno disuelto, productividad primaria y características del sedimento producen mortalidad tanto en ostiones juveniles como en los adultos (25–27).

Independientemente de qué otros factores provoquen mortalidades, el factor principal es la temperatura, dado que inicia el proceso de selección de los organismos más adaptados, como se ha demostrado en estudios que describen regulaciones moleculares como la modulación de la expresión de genes que juegan un papel importante en la adaptación celular a corto o largo

plazo respecto a cambios en el ambiente, con regulaciones extensas que ocurren a nivel transcripcional y postranscripcional (3).

2.2 Genes de respuesta a estrés térmico

En respuesta a estrés térmico se ha descrito un proceso de expresión de genes que codifican para un conjunto de proteínas denominadas HSP's (*Heat-shock proteins* por sus siglas en inglés) mediado por el factor de transcripción HSF1 (heat-shock factor-1; Fig. 1) que estimula específicamente la transcripción de los genes de HSP (28). De este conjunto de proteínas, se ha observado que la expresión de ciertas HSP's es diferencial entre familias de *C. gigas* con alta y baja supervivencia (Fig. 2).

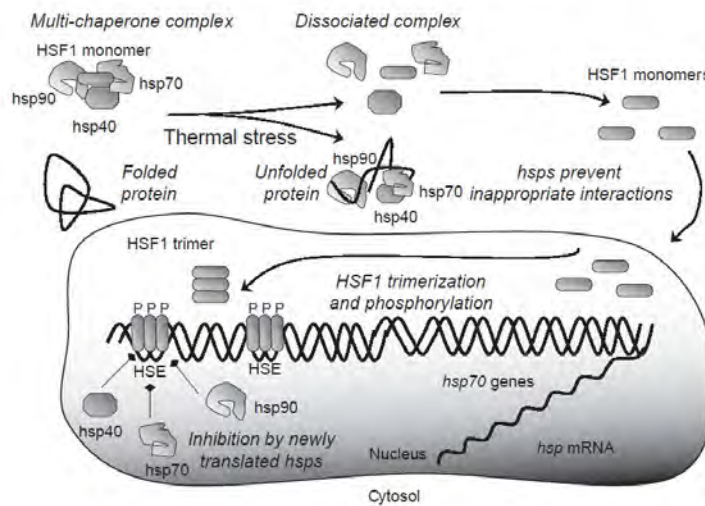


Figura 1. Modelo de activación de la regulación transcripcional para la síntesis de las proteínas HSP's (28).

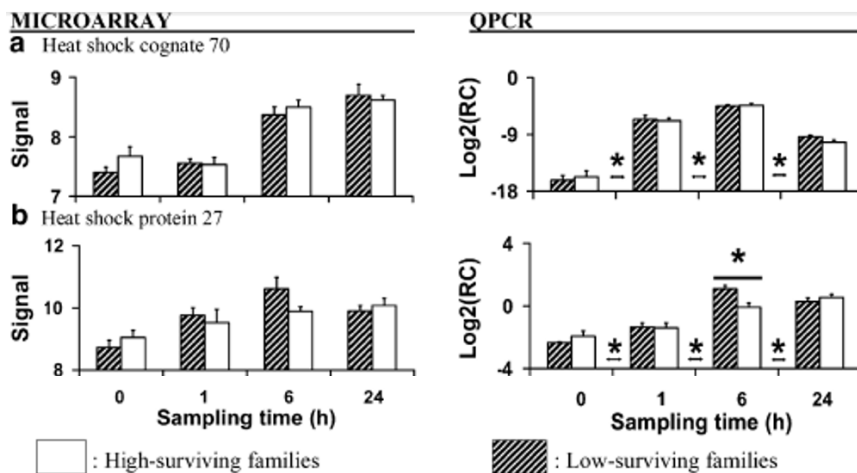


Figura 2. Comparación de los niveles de expresión de HSP's entre familias de *C. gigas* con alta y baja supervivencia (5).

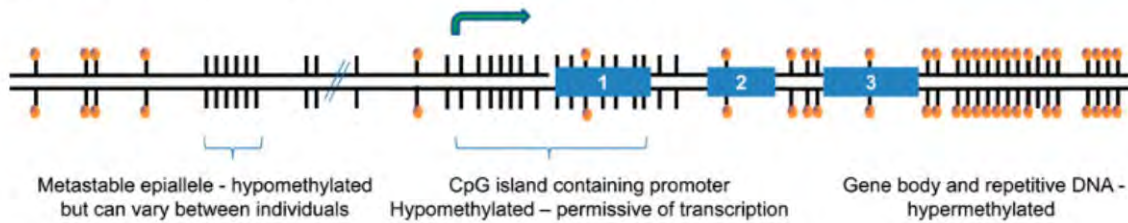
Dado que las proteínas son susceptibles de ser alteradas para interactuar con sus sustratos, el estrés térmico puede alterar su conformación y estabilidad, lo cual puede causar una pérdida de especificidad de interacción. Bajo estas condiciones las HSP's, conocidas como chaperonas moleculares, desarrollan un papel importante que permite el plegamiento de otras proteínas que pueden ser afectadas por el aumento de temperatura y se considera que contribuyen drásticamente a la tolerancia de condiciones térmicas letales. Hamdoun *et al.* (2) determinaron que, en un rango térmico de 20-37°C, el ostión japonés presenta cierta plasticidad debido a que los límites se definen por cambios en la expresión de diferentes proteínas de la familia de las HSP70. De esta familia se han descrito tres isoformas, donde HSC77 y HSC72 son expresadas constitutivamente, pero sus niveles aumentan después del estrés térmico. En contraste con otros bivalvos, *C. gigas* puede expresar una tercera proteína, la HSC69, que es típicamente detectable después del estrés térmico (37°C), sugiriéndose que está asociada con la inducción de termo-tolerancia durante un periodo de más de dos semanas de exposición a estrés térmico (29).

2.3 Regulación de la expresión génica por metilación

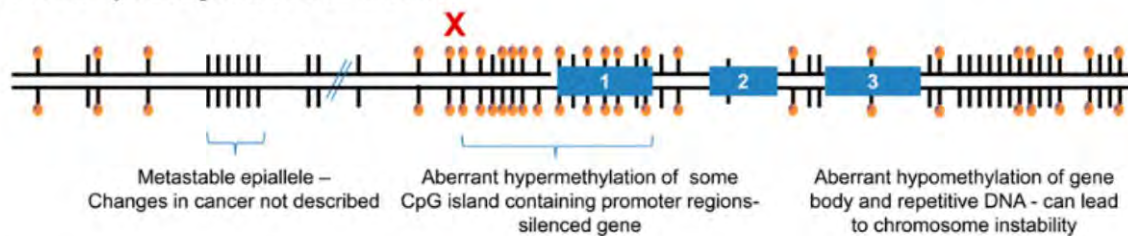
Uno de los campos de estudio relacionados con la regulación de la expresión de genes es la epigenética, la cual engloba aquellos procesos de regulación génica que ocurren fuera de la genética más conocida, y permite describir alteraciones en la expresión de genes dependiente de la metilación del ADN.

La metilación del ADN se describe como la incorporación de grupos metilo en las secuencias que presentan una cantidad elevada de G+C, organizadas en pequeñas islas CpG (Citosina seguida de guanina y unidas por un enlace fosfodiéster) que se encuentran distribuidas a lo largo del genoma (30). Estas islas CpG pueden estar localizadas en zonas intragénicas como regiones codificantes y no codificantes (Fig. 3).

A Typical DNA methylation patterns conducive to transcription



B DNA methylation patterns seen in cancer



C Maternal diet changes DNA methylation at a hypothetical metastable epiallele

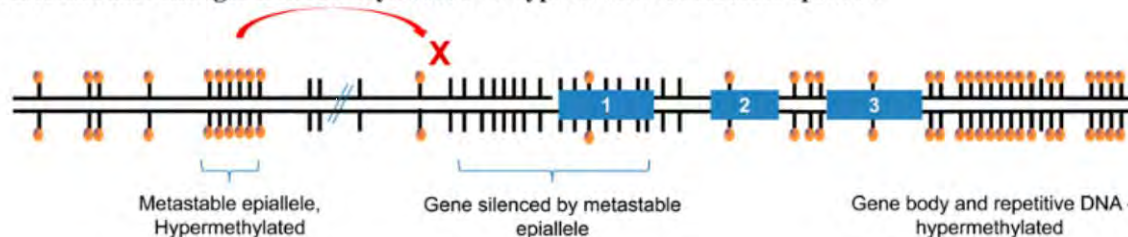


Figura 3. Esquema de metilación y regulación de la expresión de un gen. Las metilaciones (amarillo) se presentan dentro y fuera de las regiones codificantes (cajas azules). A: corresponde a un gen cuya expresión no está siendo regulada por metilación; B: regulación (31).

En la actualidad, se ha descrito que los procesos de regulación epigenéticos son esenciales para el desarrollo y diferenciación celular, ya que estos se involucran en la regulación de expresión génica. La metilación del ADN se había propuesto desde el año 1975, como un mecanismo que proporciona estabilidad sobre la expresión de un gen durante la división mitótica (20). Estos mecanismos son basados en la incorporación de los grupos metilo al ADN, que es mediado por las enzimas ADN metil-transferasas (DNMT por sus siglas en inglés) (32). En *C. gigas* existen tres isoformas de estas enzimas. La DNMT1 es mayormente expresada en las etapas tempranas del desarrollo y se sugiere que su papel es mantener la metilación de las islas CpG durante la replicación. La DNMT2 la cual también se expresa en etapas tempranas como la DNMT1, y en gónadas de ostiones adultos. La tercera metil-transferasa, DNMT3 se encuentra sobre-expresada en adultos, posiblemente debido a que lleva a cabo nuevas metilaciones esenciales para activar o desactivar genes que permitan regular los cambios ambientales que afecten la fisiología del organismo (25) (Fig. 4).

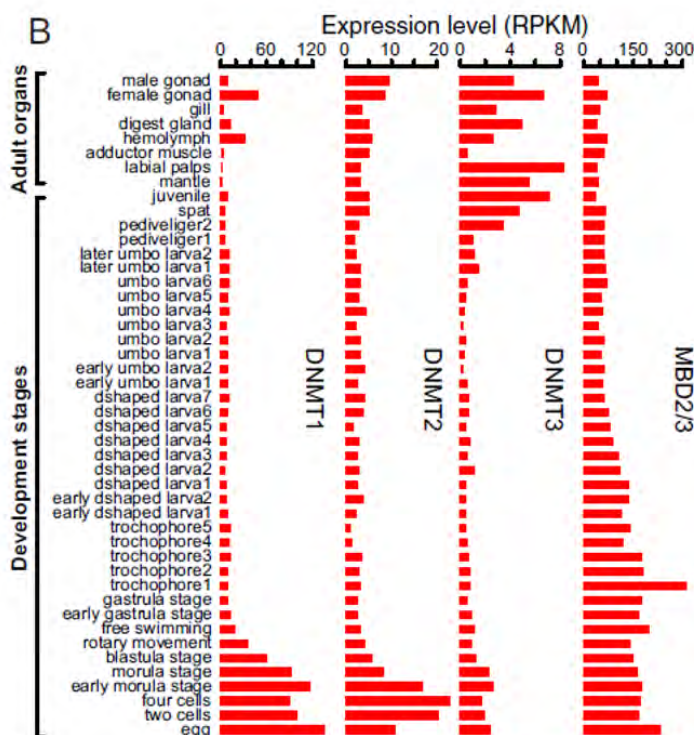


Figura 4. Esquema de metilación y regulación de la expresión de un gen. Las metilaciones (amarillo) se presentan dentro y fuera de las regiones codificantes (cajas azules). A: corresponde a un gen cuya expresión no está siendo regulada por metilación; B: regulación (33).

En el caso de la enzima DNMT3, se relaciona directamente con los estresores externos pueden modificar los patrones de metilación ocasionados por diferentes inductores como son la exposición a contaminantes, temperatura (34), salinidad, sequía, o por carencias de nutrientes en la dieta y periodos de ayuno. El cambio a corto plazo de estos patrones de metilación se ha observado que influyen en la susceptibilidad a enfermedades y propician baja resistencia ante condiciones ambientales desfavorables, y que este nuevo patrón de metilación puede ser heredado a varias generaciones. Tal es el caso de la metilación del ADN *C. gigas* que juega un papel importante en la regulación de la expresión de genes como HSP70, el cual es inducible bajo estrés térmico, y presenta una correlación entre la metilación en el promotor y la expresión del transcrito (35).

2.4 Modificación de los patrones de metilación

La parte más importante de la epigenética y sus mecanismos de acción, es que, a diferencia del genoma, esta puede sufrir cambios reversibles que pueden ser manipulados debido a que mientras que las marcas de metilación son establecidas durante el desarrollo embrionario, estas pueden modificarse durante la etapa temprana del desarrollo como resultado de la dieta administrada. Por ejemplo, dietas con ácido fólico y vitamina B12, ricas en donadores de grupos metilo (36), modifican la metilación, como fue demostrado por Khot *et al.* (2014) (37). Estos autores probaron diferentes dietas ricas en donadores de grupos metilo en hembras de ratón preñadas determinando que es posible modificar el epigenoma a partir de un tratamiento con folatos en las etapas tempranas de desarrollo.

En este trabajo se identificaron diferencias transcripcionales y patrones de metilación entre familias (hermanos completos) de *C. gigas*, usando progenies de familias termo-resistentes o termo-susceptibles.

3. JUSTIFICACIÓN

Considerando que el cultivo de *C. gigas* es realizado en áreas templadas, se ha observado que en el noroeste de México el ostión *C. gigas* se ha aclimatado desde su introducción en los años 70s. Sin embargo, las condiciones ambientales de esta región se inclinan al aumento de temperatura, lo cual se ha tornado como problemática principal, ya que se refleja en pérdidas de producción. Es por esta razón que fue necesario la creación de un programa de mejoramiento genético para la identificación de fenotipos de *C. gigas* resistentes y susceptibles al aumento de temperatura.

La selección de familias con respuestas variables a altas temperatura, permite generar información sobre las diferencias transcriptómicas y epigenéticas, con la finalidad de encontrar genes para la futura selección mediante marcadores epigenéticos que regulen la expresión génica, debido a que los marcadores epigenéticos son establecidos en el ADN por las condiciones ambientales en las que los organismos viven y se transmiten entre generaciones.

4. HIPÓTESIS

Si existen genes diferentes a las HSP's que estén directamente relacionados con la termo-resistencia, entonces se presentarán diferencias en la expresión transcripcional entre familias del ostión *Crassostrea gigas* termo-resistentes y termo-susceptibles. Así mismo, los genes identificados asociados a termo-resistencia estarán regulados por metilación.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Identificar genes de respuesta a estrés térmico y conocer si estos son regulados por metilación en el ostión japonés *Crassostrea gigas*.

5.2 Objetivos particulares

- Seleccionar familias de *C. gigas* termo-resistentes y termo-susceptibles.
- Identificar genes de respuesta a estrés térmico entre 6 familias de *C. gigas*, 3 termo-resistentes y 3 termo-susceptibles.
- Identificar genes de estrés térmico regulados por metilación en *C. gigas*.
- Identificar las regiones génicas con hiper o hipometilaciones entre fenotipos.

6. MATERIAL Y METODOS

6.1 Organismos de estudio

Ostiones *Crassostrea gigas* fueron obtenidos del programa de mejoramiento genético (Ibarra, 2013) del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). Este programa se originó cruzando tres poblaciones de *C. gigas*, provenientes de Australia, Chile y EUA. Después de varias generaciones de entrecruzamientos, con fines de integrar los tres genomas, se obtuvo un pie de cría con tres líneas de 50 familias cada una. De una de esas líneas con un total de 50 familias, se evaluaron e identificaron las tres familias con mayor termo-resistencia y las tres con la mayor termo-susceptibilidad a altas temperaturas después de ser sometidas a un reto térmico agudo.

El reto térmico se desarrolló utilizando 25 organismos de cada familia (con talla media de 2.65 cm). Los ostiones se colocaron en transcriptómicas recipientes de vidrio con aireación constante y recambio de agua (35 ups). Estos recipientes se distribuyeron de forma aleatoria y sumergidos en tanques de 50 L con agua marina a 40°C, considerando este rango como requerido para la inducción de respuesta a estrés térmico (2). Las mortalidades fueron registradas cada hora hasta obtener la mortalidad total de los organismos. La selección de termo-resistencia y termo-susceptibilidad de familias fue basada en el tiempo medio en morir. Se seleccionaron las tres familias que presentaron mayor tiempo en morir y se establecieron como termo-resistentes (RR), de igual forma, se seleccionaron las tres familias con menor tiempo en morir consideradas como termo-susceptibles (SS).

Posteriormente, basados en los reportes de temperaturas en campo (38), ostiones de las familias RR y SS no expuestas al reto térmico agudo, fueron sometidas a un régimen de temperaturas oscilantes de 26°C a 34°C con un ciclo de 24 h, durante 30 días (Fig. 5). Se tomaron muestras de tejido de branquia de cada familia al inicio y al final del experimento, con la finalidad de extraer ADN y ARN para los análisis transcriptómicos y epigenéticos.

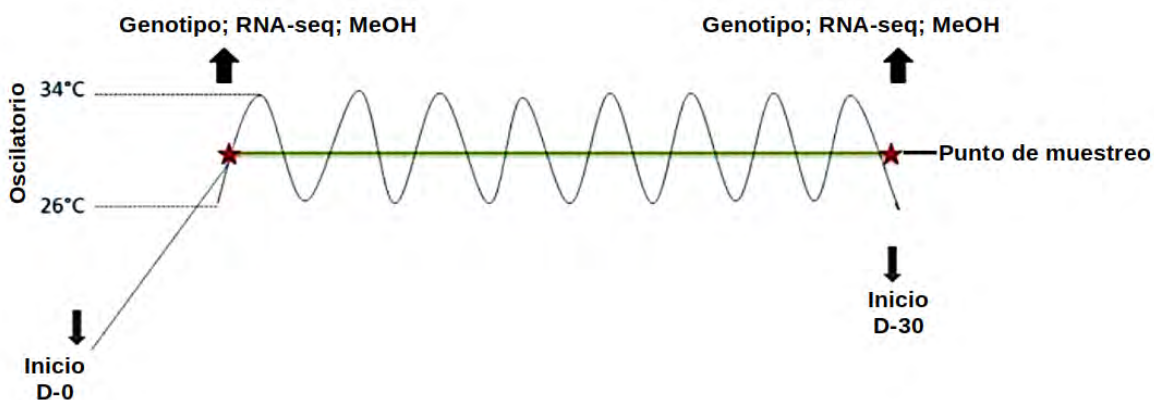


Figura 5. Reto térmico crónico con oscilaciones de temperatura basadas registros de campo.

6.2 Genotipificación de las familias termo-resistentes y termo-susceptibles

Previo a los análisis transcriptómicos y epigenéticos, se llevó a cabo la verificación individual de su ascendencia putativa familiar. Esto se realizó con análisis de parentesco mediante la amplificación de regiones microsatélites y utilizando el protocolo de exclusión, basados en los genotipos de los progenitores y la combinación de sus alelos con los descendientes.

6.2.1 Extracción de ADN

A partir de ostiones de las familias termo-susceptibles S05, S32, S35 y termo-resistentes R30, R52 y R59, se extrajo ADN de tejido de branquia de 10 muestras iniciales por familia (tiempo cero), 10 muestras por familia del día 30, y 12 muestras correspondientes a los progenitores de las familias mencionadas. La extracción se realizó utilizando 2 mg de tejido de branquia en 400 μ l de buffer de lisis (NaCl 100mM, Tris 50mM, EDTA 100mM y SDS 1%) y se homogenizó con 100 mg de perlas para macerar. Las muestras se incubaron durante 40 min a 60°C, se maceraron durante 50 s utilizando el equipo FastPrep-24 MP™ y se incubaron nuevamente durante 20 min a 60°C. Posteriormente se adicionaron 200 μ l de NaCl 6 M y se agitó vigorosamente. Las muestras se colocaron en hielo durante 10 min y fueron centrifugadas por 10 min (12,000 g) para la recuperación de la fase acuosa. Se adicionó 1 ml de etanol absoluto frío, se mezcló por inversión y se centrifugaron durante 10 min. Se decantó el sobrenadante, se adicionó 1 ml de etanol al 70% y se centrifugaron. Se retiró el sobrenadante, se secó el botón celular por 30 min para finalmente resuspender en 100 μ l de agua MilliQ estéril. La cuantificación de ADN se realizó en el espectrofotómetro Nanodrop 2000 Thermo Scientific™.

6.2.2 Determinación de integridad del ADN mediante PCR punto final

El ADN extraído fue evaluado mediante la amplificación del gen β -actina utilizando la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa: *Polimerase Chain Reaction*). Cada reacción de PCR de un volumen total de 12.5 μ l, se preparó con 2.5 μ l de 5X GreenBuffer, 2 μ l de $MgCl_2$ (2.5 mM), 0.66 μ l de dNTP's (0.25 mM), 0.1 μ l de enzima GoTaq Flexi (Promega) (1 U), 0.13 μ l del oligonucleótido en sentido 5' GTCAAGAGGACGGGGTGTT 3' (0.2 μ M) y 0.13 μ l del oligonucleótido en antisentido 5' CCCAGAGCAAGAGAGGTATCC 3' (0.2 μ M) para el gen β -actina (39), 5.8 μ l de agua milliQ y 1 μ l de ADN templado (100 ng). El programa de amplificación incluyó una etapa inicial de desnaturalización a 94°C durante 3 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C (30 s), alineamiento de oligonucleótidos a 60°C (30 s), fase de extensión (30 s) y la fase de extensión final a 60°C por 4 min.

6.2.3 Estandarización de amplificación de microsatélites

La amplificación de las regiones microsatélites consistió en elaborar reacciones de PCR como se mencionó anteriormente (apartado 5.2.2), utilizando los oligonucleótidos correspondientes para cada microsatélite. La temperatura óptima de alineamiento sugerida por los autores (Tabla I), se tomó como centro del gradiente de temperatura, considerando $\pm 5^\circ C$. La estandarización de la temperatura de alineamiento de los microsatélites nos permitió seleccionar los que pueden utilizarse para el análisis de parentesco.

Tabla I. Listado de primers para amplificar los microsatélites para el análisis de parentesco

Loci		Secuencia	Temperatura de alineamiento	Referencia	ID de GenBank
ucdCg02	F	TTGCAGGAAGCAAGAGATGA	55°C	(40)	-
	R	CTTGTTAACTGCCGGTGAGG			
ucdCg03	F	TTGAATGAACATCGTTTG	52°C	(40)	-
	R	GATCATAGAATAAACAGAAC			
ucdCg06	F	AAGCAACTATCAGTTTTTGGTAGC	55°C	(40)□	AF051172
	R	AATGAGCTGACAGTTCATAGGC			
ucdCg120	F	GGGTGAGATTTAGGGGGAGA	59°C	(41)	AF468530
	R	CTCCATCAAACCTGCCAAAC			
cmrCg204	F	ATTCCTCAAACGCATAAAAAAGTGT	50°C	(42)	-
	R	TCCACCGAACAAAATAGAGCAATA			
L48	F	TCAAACCATCTGCTCGTCTACG	60°C	(4)	AF170852
	R	TCCGAAAATCCAGGAATACCGG			
L10	F	GGTCAATTCAAAGTCAATTTCCCC	55°C	(4)	AF170850
	R	CATGTTTTCCCTTGACTGATCC			
CG49	F	CATCAGGGGTAAATTAAGTAAGC	50°C	(43)	Y12086
	R	CCACAGACGATTTCATATATCCTG			

Los productos de PCR del gradiente fueron separados en geles de agarosa al 1% con TBE en un volumen total de 40 ml y 0.5 µl de GelRed. Se realizó la electroforesis a 80 V constantes durante 20 min utilizando TBE como solución amortiguadora en la electroforesis.

6.2.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida

Una vez que se establecieron las condiciones óptimas para cada microsatélite, se procedió con la genotipificación. Esta consistió en la amplificación de los microsatélites por PCR como se describió en el apartado 5.2.2. La electroforesis se llevó a cabo usando geles de poliacrilamida, los cuales permiten identificar diferencias de 1 base entre alelos.

Previo a la elaboración de los geles, vidrios de 35 cm de ancho y 45 cm de largo se colocaron sobre una base horizontal. Se limpiaron con etanol absoluto, se dejaron secar y se les colocó antiadherente (Anti-fog™) para prevenir que el gel se adhiriera a los vidrios. Se posicionaron separadores (1 mm) entre los vidrios y se preparó la solución del gel de poliacrilamida mezclando 70 ml de acrilamida: bis-acrilamida 19:1 (5%) (ThermoFisher Scientific), 400 µl de PSA (Persulfato de amonio; Bio-Rad) al 10% y 40 µl de TEMED (tetrametiletildiamina; Bio-

Rad). La solución de poliacrilamida se adicionó entre los vidrios y se posicionó el peine. Por último, se colocaron 2 pinzas para prensar los vidrios y evitar que queden separados. Se dejó polimerizar el gel durante 30 min. Posteriormente se retiraron las pinzas y se montó en una cámara de electroforesis vertical (ThermoFisher Scientific). Se adicionó el amortiguador de electroforesis (TBE), el peine fue retirado, se invirtió y se colocó con las cerdas hacia dentro, esto con la finalidad de cargar las muestras entre los moldes del peine.

La electroforesis inicial se realizó a 2,000 v constantes, 70 mA y 70 w durante 20 min, para obtener una temperatura aproximada a 50 °C previo a colocar las muestras. Posteriormente, a las muestras se les adicionó la solución de carga (formamida 98%, EDTA 10 mM, azul de bromofenol 0.025%, xilencianol 0.025%), se dejaron incubar a 95°C durante 5 min y se colocaron en hielo. Las muestras fueron cargadas en los pozos del peine y se continuó la electroforesis con las condiciones antes mencionadas durante 2 horas. Al concluir, se retiró el amortiguador de electroforesis y el gel se desmontó. Los vidrios se despegaron cuidadosamente quedando el gel adherido a uno de los vidrios.

El revelado del gel se realizó con la mezcla de las soluciones: 1) 75 ml de agua y 1.32 g de agarosa, y 2) 55 ml de agua con 0.7 µl de SyberGold (Invitrogen). Esta mezcla se colocó sobre el gel de poliacrilamida y se dejó gelificar por aproximadamente 20 min, y posteriormente se retiró cuidadosamente. La visualización del gel se realizó en el fotodocumentador HITACHI FMBIO III Multi-View™ utilizando el filtro para SyberGold.

6.2.5 Análisis de parentesco

Para descartar contaminación de organismos no pertenecientes a las familias experimentales, se realizó un análisis de parentesco. En este proceso se utilizó el método de exclusión, basado en las reglas de herencia mendeliana (44). Para los progenitores de cada familia (n = 12) se asignó el tamaño de los alelos del genotipo amplificado según cada microsatélite. Por otra parte, de los 10 organismos de cada familia utilizados del día cero y del día 30, se amplificaron las regiones microsatélite y se les asignó un genotipo, según su tamaño, para ser comparados

con los genotipos de los progenitores. Los datos fueron capturados en una base de datos para su posterior análisis.

La relación entre progenitores y su descendencia se determinó con el tamaño de los alelos, excluyendo en su caso los genotipos no relacionados. Finalmente, para el análisis transcriptómico, se seleccionaron tres ostiones como réplicas biológicas de cada familia del día cero del experimento oscilatorio y tres ostiones por familia del día 30.

6.3 Análisis transcriptómico

Se muestrearon 18 ostiones genotificados (3 por familia) del día cero y 18 del día 30 (3 ostiones por familia) del ensayo oscilatorio, tomando aproximadamente 2 mg de branquia que fue colocada en 500 μ l de Tripure Isolation Reagent (Roche Applied Science). Se maceró el tejido con pistilos de plástico y se centrifugó a 12,000 g durante 5 minutos a 4°C. Se retiró la fase acuosa y se colocó en tubos de 1.6 ml. Se adicionaron 100 μ l de cloroformo frío (4°C), se agitó vigorosamente y se centrifugó a las mismas condiciones durante 5 min. Un volumen aproximado de 200 μ l de la fase acuosa (parte superior) fue recuperada y colocada en un tubo nuevo. Se agregaron 250 μ l de isopropanol, se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó por 5 min a 4°C. El sobrenadante se descartó y se lavó el botón celular adicionando 1 ml de etanol al 70%. Nuevamente se centrifugó por 5 min, se descartó el sobrenadante y se colocó el tubo a temperatura ambiente para secar el botón celular. El ARN se resuspendió en 50 μ l de agua MilliQ estéril y se almacenó a -80°C. La integridad del ARN fue corroborada en geles de agarosa (1%) utilizando TAE; la electroforesis se realizó por 40 min a 70 voltios constantes. Las muestras fueron cuantificadas con espectrofotometría con el equipo Nanodrop (Thermo Fisher).

6.3.1 Secuenciación ARN-Seq

El ARN fue enviado en hielo seco a la unidad de secuenciación masiva y bioinformática del Instituto de Biotecnología de la UNAM del IBT, Cuernavaca, México. La integridad del ARN (RIN por sus siglas en inglés) (45) fue verificada con el Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA) y se

procedió a preparar las librerías para los análisis transcriptómicos utilizando los protocolos estándares de Illumina RNA-Seq.

Se construyeron 18 librerías de terminaciones pareadas (paired-end) correspondiente a tres réplicas biológicas de cada una de las seis familias en el día cero, y lo mismo para 18 librerías de cada una de las seis familias expuestas durante 30 días a estrés térmico oscilatorio. La secuenciación se realizó en la plataforma HiSeq2000 de Illumina obteniendo lecturas pareadas de 101 pb (2x100).

6.3.2 Análisis bioinformático

La calidad de las lecturas fue evaluada utilizando el programa FastQC, y posteriormente se limpiaron con el programa trimmomatic-0.32 (<https://github.com/timflutre/trimmomatic>), eliminando los adaptadores de ILLUMINA y lecturas con calidad por debajo de $Q = 30$ y utilizando las siguientes opciones: ILLUMINACLIP TruSeq3-PE.fa:2:30:10 LEADING:30 TRAILING:30 SLIDINGWINDOW: 4: 20 MINLEN:75.

Con las lecturas limpias se realizó el mapeo de secuencias en el genoma de referencia de *C. gigas* (http://owl.fish.washington.edu/halfshell/genomicdatabank/Crassostrea_gigas.oyster_v9.dna_sm.toplevel.fa) utilizando el programa HISAT2-v2.1.0. Posteriormente se ensambló el transcriptoma utilizando el programa StringTie-v1.3.4 (46,47).

6.3.3 Análisis de expresión diferencial

Previo al análisis de expresión diferencial, se corroboró la correlación de las réplicas biológicas mediante un análisis de componentes principales (PCA) (<https://github.com/trinityrnaseq/trinityrnaseq/wiki/QC-SamplesandBiologicalReplicates>).

Posteriormente, la abundancia de transcritos fue estimada con el programa StringTie-v1.3.4, donde se cuantificó en FPKM (*Fragments Per Kilobase Million*). La matriz de abundancia generada fue utilizada para calcular la expresión diferencial con el paquete de R Ballgown (48), usando los parámetros de $FC > 2$ y $P < 0.05$. Las comparaciones de expresión diferencial se

realizaron entre las familias termo-resistentes y las familias termo-susceptibles. Se generaron las matrices de comparación al día cero y al día 30.

6.3.4 Anotación del transcriptoma

Para la anotación del transcriptoma, se generaron los archivos en formato gff de cada una de las réplicas mediante la aplicación gffcompare-v0.10.4 (49). De los archivos gff generados, se utilizaron las coordenadas de cada uno de los transcritos mapeados y se compararon con el genoma anotado de *C. gigas* (http://owl.fish.washington.edu/halfshell/genomicdatabank/Crassostrea_gigas.oyster_v9.40.gff 3). Posteriormente, la matriz obtenida con la identificación de transcritos sobre-regulados y sub-regulados de las matrices al día cero y al día 30 fueron utilizadas para análisis posteriores. Adicionalmente, el número total de intrones y de exones presentes en el transcriptoma fueron cuantificados para la identificación de nuevas variantes génicas.

6.3.5 Análisis de enriquecimiento ontológico

El análisis ontológico de los transcritos se llevó a cabo utilizando la base de datos UniProtKB (www.uniprot.org). Se tomó el listado de las matrices de expresión diferencial al día cero y al día 30. Las matrices fueron comparadas en UniProtKB y se extrajeron las ontologías asignadas para cada gen expresado diferencialmente y se procedió con el análisis de enriquecimiento de la comparación entre los genes del día cero y el día 30. Los términos ontológicos enriquecidos correspondientes a los genes expresados diferencialmente se graficaron con el paquete de R, Revigo (50) y WEGO (51).

6.4 Análisis de metilación entre fenotipos termo-resistentes y termo-susceptibles

La evaluación de la metilación se realizó en tres individuos de dos familias termo-resistentes y tres ostiones de dos familias termo-susceptibles muestreadas al día 30. De las 12 muestras de branquias se extrajo el ADN como se mencionó en el apartado 5.2.1., y fueron enviadas a la empresa Genewiz (www.genewiz.com), en donde se elaboraron las librerías genómicas utilizando el kit Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library (Swift, MI). Las librerías fueron secuenciadas mediante secuenciación de bisulfito del genoma completo (WGBS por sus siglas en inglés) en la

plataforma de Illumina HiSeq, obteniendo secuencias pareadas de 150 pb (2x150) y una cobertura de 30X.

6.4.1 Procesamiento de secuencias de WGBS

Para el uso de las secuencias en posteriores análisis, primeramente se realizó la limpieza dividida en dos sesiones. La primera sesión consistió en eliminar los adaptadores de secuenciación (Illumina) utilizando el programa Trimmomatic-v0.32 (52). La segunda sesión de limpieza, sugerida por la manufactura del kit Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library (Swift, MI), consistió en eliminar las primeras 10 pb del extremo 5' de cada secuencia.

Con las secuencias limpias se realizó el mapeo en el genoma de referencia mencionado en el apartado 5.3.2 utilizando el programa Bowtie2-v2.3.4.2. Los archivos obtenidos fueron alineados con el programa BisMark-v0.20.0 (53) utilizando la opción PE (pair end), y se generaron datos en formato bam y un reporte de alineación, descartando las secuencias duplicadas. Del reporte de alineación, se tomó el porcentaje de metilación global en contexto CpG de cada una de las 12 muestras y se transformó a arcoseno para realizar una comparación entre los niveles de metilación por familia y por fenotipo mediante un análisis estadístico ANOVA con el programa STATISTICA-v8.

6.4.2 Extracción de regiones metiladas entre familias termo-resistentes y termo-susceptibles

Para la localización de las regiones metiladas, se utilizaron los archivos en formato .bam, obtenidos del programa BisMark, y se indexaron en el paquete de R llamado MethylKit-v1.12.0 (54). Una vez indexados los archivos, se calcularon las regiones diferencialmente metiladas (DMR por sus siglas en inglés) utilizando los parámetros de 5X de cobertura y > 25% de diferencias de metilación (considerando > 25% como hipermetilado y < 25% como hipometilado), evaluadas en ventanas de 100 pb a lo largo del genoma de cada muestra.

Como resultado se generaron archivos de datos con coordenadas en formato bed y formato texto. Una vez identificadas las coordenadas en el archivo de texto de las DMR hipermetiladas e hipometiladas, se utilizó el programa bedtools-v2.28.0 (55), complementando este análisis con

archivos de seguimiento del genoma con coordenadas de promotores, exones e intrones. Las DMR hipermetiladas e hipometiladas fueron extraídas considerando el gen a las que fueron asignados por sus coordenadas. Se generó un listado de todos los genes con DMR identificadas en promotores, exones e intrones entre fenotipos.

Los archivos con formato bed se utilizaron para la visualización de las DMR hipermetiladas en el genoma mediante el programa IGV-2.4.14.

6.4.3 Análisis de enriquecimiento ontológico de DMR identificadas entre fenotipos

Del listado total de DMR hipermetilados e hipometilados, y asignados a un ID de gen en el genoma, se comparó con la base de datos UniProtKB mediante blast utilizando el ID del gen. Se generaron tres bases de datos correspondientes al total de DMR hiper e hipometiladas en promotores, exones e intrones. Posteriormente, se extrajo la ontología de cada uno de los genes y se introdujeron en el programa WEGO-v2.0 (51) para generar los gráficos de enriquecimiento ontológico.

6.5 Ontologías de genes expresados diferencialmente entre fenotipos con regiones (DMR) hiper o hipometiladas en promotores, exones e intrones

De las bases de datos ontológicas generadas en el análisis transcriptómico se extrajeron las coordenadas de los genes y transcritos expresados diferencialmente entre fenotipos y se compararon con las bases de datos generadas del análisis de metilación. Se combinaron los valores de expresión diferencial con los valores de DMR hiper e hipometiladas y se graficaron con el paquete de R ballgown-v2.18.0 (47).

7. RESULTADOS

7.1 Evaluación de familias termo-resistentes y termo-susceptibles

Las diferencias entre las familias para su asignación a fenotipos termo-resistentes o termo-susceptibles, se observaron al comparar las horas medias en morir (hora media en morir) del 50% de los organismos por familia. En general, la primera mortalidad ocurrió a las 9.3 h, y con el último registro de individuo en morir a las 41 h. Considerando las horas medias en morir por familia, se seleccionaron las familias termo-resistentes y termo-susceptibles como se muestra en la Tabla II.

Tabla II. Horas medias en morir para selección de fenotipos.

	Fenotipos			
	Susceptible		Resistente	
Registro de mortalidad	SS05	SS35	RR52	RR59
Inicial	4	6	7	10
Final	28	22	31	32
Hora media en morir	12.5	9.3	15.7	16.2

7.2 Genotipificación de las familias termo-resistentes y termo-susceptibles

El ADN obtenido, correspondiente a las muestras de las 6 familias, tuvo una concentración promedio de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, lo cual se consideró suficiente para proceder con el análisis de parentesco. La cantidad de ADN obtenida del músculo de los progenitores (macho y hembra) fue entre 50 a 150 $\text{ng}/\mu\text{l}$. Para verificar la integridad del ADN se elaboraron reacciones de PCR amplificando el gen β -actina (Fig. 6) que presentó un amplicón de 145 pb.

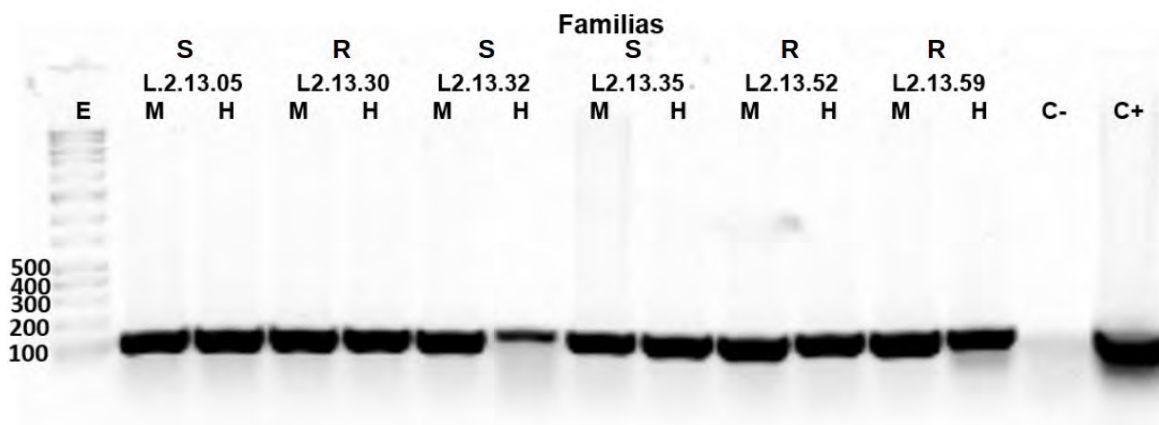


Figura 6. Amplificación del gen β -actina utilizando el ADN extraído de los padres. E: Marcador de tamaño Low DNA Mass Ladder (INVITROGEN™); M: Macho; H: Hembra; L2.13.05, 30, 32, 35, 52 y 59; C-: control negativo; C+: control positivo; T: familia termo-resistente y S: familia termo-susceptible.

La amplificación del gen β -actina a partir del ADN extraído de tejido de músculo de los padres, corroboró la buena integridad del ADN, siendo viable para llevar a cabo la estandarización de los oligonucleótidos para la amplificación por PCR de los microsatélites CG49, L10, L48, ucdCg02, ucdCg03, ucdCg06, ucdCg12 y cmrCg204.

7.3 Estandarización de amplificación de microsatélites

La estandarización de la temperatura óptima de amplificación de los microsatélites basadas en gradientes de temperatura no mostró resultados diferentes respecto a los reportados por los autores (Tabla I). Por lo tanto, las temperaturas sugeridas por esos autores fueron las utilizadas para los análisis posteriores.

Los microsatélites ucdCg02 y ucdCg03 no se lograron amplificar con éxito, y los microsatélites como ucdCg120 y el cmrCg204 no fueron adecuados para el análisis de parentesco (Tabla III) debido a que no presentaron variación para diferenciar a nivel de parentesco.

Tabla III. Temperatura para amplificar los microsatélites

Loci	Temperatura de alineamiento	Resultado de PCR
ucdCg02	55°C	No se logró obtener amplificación
ucdCg03	52°C	No se logró obtener amplificación
ucdCg06	55°C	Apto para análisis de parentesco
ucdCg120	59°C	No apto para análisis de parentesco
cmrCg204	50°C	No apto para análisis de parentesco
L48	60°C	Apto para análisis de parentesco
L10	55°C	Apto para análisis de parentesco
CG49	50°C	Apto para análisis de parentesco

7.4 Análisis de parentesco para muestras del día cero

El análisis de exclusión para las 6 familias para el día cero y día 30, se sustentó en el análisis comparativo, donde los alelos portados por los progenitores fueron observados en la descendencia, bajo la hipótesis de una herencia Mendeliana. Los resultados se presentan en la Tabla IV.

Tabla IV. Análisis de parentesco de las progenies para las cuales se obtuvo el transcriptoma antes y después de un reto térmico oscilatorio de 30 días

Día 0 Familia 05		Microsatélites							
		<i>ucdCg06</i>		<i>L10</i>		<i>L48</i>		<i>CG49</i>	
<i>Padres</i>	<i>M</i>	151	149	173	145	141		173	159
	<i>H</i>	163	150	147	115	138		181	140
<i>Organismo 1</i>		151	149	145	115	141	138	181	159
<i>Organismo 2</i>		150	149	173	115	141	138	173	140
<i>Organismo 3</i>		163	149	173	147	141	138	181	159
<i>Organismo 4</i>		163	149	145	115	141	138	181	173
<i>Organismo 5</i>		151	149	173	115	141	138	181	173
Día 0 Familia 30		Microsatélites							
		<i>ucdCg06</i>		<i>L10</i>		<i>L48</i>		<i>CG49</i>	
<i>Padres</i>	<i>M</i>	140		158	146	144	113	158	135
	<i>H</i>	148	143	146	135	142		190	165
<i>Organismo 1</i>		148	140	158	135	142	113	190	135
<i>Organismo 2</i>		148		158	146	142	113	190	135
<i>Organismo 3</i>		143		158	146	144	142	165	158
<i>Organismo 4</i>		143	139	146	135	144	142	190	158
<i>Organismo 5</i>		143		158	146	144	142	190	158
Día 0 Familia 32		Microsatélites							
		<i>ucdCg06</i>		<i>L10</i>		<i>L48</i>		<i>CG49</i>	
<i>Padres</i>	<i>M</i>	147	143	161	132	150	138	167	151
	<i>H</i>	139		145	134	151		170	158
<i>Organismo 1</i>		155	139	161	145	151	150	158	151
<i>Organismo 2</i>		163	155	145	132	138		170	
<i>Organismo 3</i>		163	155	161	145	138		158	151
<i>Organismo 4</i>		155	139	134	132	151	150	170	
<i>Organismo 5</i>		163	146	161	134	151	150	158	151
Día 0 Familia 35		Microsatélites							
		<i>ucdCg06</i>		<i>L10</i>		<i>L48</i>		<i>CG49</i>	
<i>Padres</i>	<i>M</i>	150		158	131	150	144	165	151
	<i>H</i>	160	151	158	149	142	139	158	
<i>Organismo 1</i>		151	150	149	131	150	142	165	158
<i>Organismo 2</i>		151	150	158	149	150	139	158	151
<i>Organismo 3</i>		160	150	158	131	150	139	151	
<i>Organismo 4</i>		151	150	158	131	144	142	158	151
<i>Organismo 5</i>		151	150	158	149	144	139	165	158
Día 0 Familia 52		Microsatélites							
		<i>ucdCg06</i>		<i>L10</i>		<i>L48</i>		<i>CG49</i>	
<i>Padres</i>	<i>M</i>	151	149	145		140	139	159	133
	<i>H</i>	163	150	158	145	138	132	135	

Organismo 1		151	149	158	145	140	132	133	
Organismo 2		150	149	158	145	138	132	133	135
Organismo 3		163	149			138	132	159	
Organismo 4		163	149	158	145	140	132	159	
Organismo 5		151	149			141	137	159	
Día 0 Familia 59		<i>Microsatélites</i>							
		<i>ucdCg06</i>		<i>L10</i>		<i>L48</i>		<i>CG49</i>	
Padres	M	150	141	159	148	150	141	150	
	H	160	145	136	115	133	121	168	150
Organismo 1		150	145	159	115	141	121	159	
Organismo 2		160	150	148	136	141	121	168	150
Organismo 3		160	150	148	136	141	121	150	
Organismo 4		160		159	136	150	121	159	
Organismo 5		160		148	115	141	121	159	150
Día 30 Familia 05		<i>Microsatélites</i>							
		<i>ucdCg06</i>		<i>L10</i>		<i>L48</i>		<i>CG49</i>	
Padres	M	151	149	175	145	141		176	160
	H	162	150	146	118	135	132	183	141
Organismo 1		162	151	175	118	141	132	160	141
Organismo 2		162	149	175	118	141	135	160	141
Organismo 3		151	150	145	118	141	135	160	141
Organismo 4		151	150	145	118	141	135	160	141
Organismo 5		150	149	145	118	142	135	183	176
Día 30 Familia 30		<i>Microsatélites</i>							
		<i>ucdCg06</i>		<i>L10</i>		<i>L48</i>		<i>CG49</i>	
Padres	M	140		159	145	141	113	158	137
	H	150	142	145	133	139		190	165
Organismo 1		142		159	133	141	139	165	137
Organismo 2		150	140	145	133	139	113	165	158
Organismo 3		142		145	133	141	139	190	158
Organismo 4		150		159	145	141	139		
Organismo 5		150		159	133	141	139	190	158
Día 30 Familia 32		<i>Microsatélites</i>							
		<i>ucdCg06</i>		<i>L10</i>		<i>L48</i>		<i>CG49</i>	
Padres	M	162	140	161	130	145	134	151	
	H	158	150	161	132	145		170	158
Organismo 1		162	150	161	132	145		158	
Organismo 2		158	140	132	130	145	134	170	158
Organismo 3		150	140	161	132	145		170	
Organismo 4		158	140	161	132	145		170	158
Organismo 5		158	140	161	132	145		170	158
Día 30 Familia 35		<i>Microsatélites</i>							

		<i>ucdCg06</i>		<i>L10</i>		<i>L48</i>		<i>CG49</i>	
<i>Padres</i>	<i>M</i>	150		155	130	145	140	165	151
	<i>H</i>	161	151	155	149	139	135	160	
<i>Organismo 1</i>		161	150	155	130	145	139	160	151
<i>Organismo 2</i>		151	150	149	130	140	139	165	160
<i>Organismo 3</i>		161	150	155	130	145	139	160	151
<i>Organismo 4</i>		151	150	155	149	140	135	151	
<i>Organismo 5</i>		151	150	149	130	141	140	165	
<i>Día 30 Familia 52</i>		<i>Microsatélites</i>							
		<i>ucdCg06</i>		<i>L10</i>		<i>L48</i>		<i>CG49</i>	
<i>Padres</i>	<i>M</i>	151	142	148		135	133	159	135
	<i>H</i>	162	142	159	148	133	130	137	
<i>Organismo 1</i>		151	142	148		133		135	
<i>Organismo 2</i>		160	142	159	148	133		159	137
<i>Organismo 3</i>		162		159	146	133	130	159	137
<i>Organismo 4</i>		162		148		133		159	137
<i>Organismo 5</i>		162	142	148		135	130	159	137
<i>Día 30 Familia 59</i>		<i>Microsatélites</i>							
		<i>ucdCg06</i>		<i>L10</i>		<i>L48</i>		<i>CG49</i>	
<i>Padres</i>	<i>M</i>	151	142	160	147	145	138	157	150
	<i>H</i>	160	148	139	118	130	119	168	150
<i>Organismo 1</i>		160		160	118	145	130	157	
<i>Organismo 2</i>		160	151	147	118	138	130	157	
<i>Organismo 3</i>		160		160	139	145	119	157	
<i>Organismo 4</i>		160		160	139	138	130	150	
<i>Organismo 5</i>		160		160	118	145	130	168	150

Como se observa en la tabla IV, los alelos observados en los progenitores y progenie con el microsatélite CG49, permitieron comparar los genotipos para la determinación de parentesco para las familias 05, 52 y 59. Sin embargo, en el caso de la familia 52, es posible la existencia de un alelo nulo en la madre, lo cual se corroborará con el resto de los microsatélites L10, L48 y ucdCg06. En las familias 30, 32 y 35, los genotipos de los padres indican que corresponden a los observados con la descendencia. Sin embargo, el organismo #3 de la familia 35 presenta un genotipo que no corresponde a la combinación esperada de los padres, por lo que este individuo fue excluido como descendiente de estos progenitores. El microsatélite cmrCg204, se consideró no apto para este tipo de análisis, debido a que presenta muy baja variabilidad de

alelos (154 y 155 pb) que no permite diferenciar a nivel parentesco, ya que estas regiones están conservadas en las 6 familias con el mismo tamaño de alelos.

La comparación de genotipos con el microsatélite L48 se dificultó debido al alto número de *stutters*. Sin embargo, estas bandas inespecíficas sirvieron como referencia para determinar el tamaño correspondiente a los alelos del genotipo de los progenitores, ya que se seleccionó como el tamaño del alelo el amplicón de mayor intensidad. La comparación de genotipos nos indicó la combinación de alelos en la descendencia que corresponde a los progenitores, donde a partir de padres homocigotos, presentan el mismo genotipo.

El microsatélite ucdCg120, mostró una variación para la familia 35, pero no es útil para complementar la información previamente establecida con los otros *loci* analizados, ya que se sabe que el organismo #3 de la familia mencionada, no coincide con los genotipos de los padres, lo cual difiere con los resultados obtenidos utilizando ucdCg120. Con el microsatélite ucdCg06, se corroboró que la descendencia de las familias 05, 52 y 59 son correctas. Para el resto de las familias, se sugiere la presencia de alelos nulos en el padre de la familia 30. Así mismo, en el uso de los otros *loci*, no se presentan casos de alelos nulos, sugiriendo que el padre de la familia 30 no es homocigoto.

Con el microsatélite L10, se obtuvo que los genotipos para las seis familias coincidieron entre descendencia y progenitores, por lo tanto, los organismos analizados tienen un lazo parental con sus progenitores.

7.5 Análisis de parentesco de muestras correspondientes al día 30

Las muestras obtenidas en este muestreo fueron sometidas al mismo análisis de parentesco anteriormente mencionado, utilizando los genotipos previamente establecidos para los padres.

Con el microsatélite ucdCg120 se observó que los genotipos de la descendencia poseen una variación con sus padres, como el organismo 4 de la familia 05, el 2, 3 y 4 de la familia 32 y el 1, 3 y 5 de la familia 35 (Tabla IV). El resto de los organismos corresponden a un genotipo derivado

a partir de sus progenitores. Con el microsatélite ucdCg120 no se considera un análisis completo, por su variedad de alelos (56). Por lo tanto, este *loci* no se considera uno que permita diferenciar organismos a nivel de parentesco.

Para complementar este resultado, se analizaron las muestras con el microsatélite CG49, donde se observó la relación existente entre los progenitores y su descendencia. En este caso, la familia 05 corresponde completamente a la relación de genotipos esperado. La descendencia de la familia 30 también se relaciona con el genotipo de los padres, excepto el organismo 4, dado a que no se observó un amplicón. La descendencia de la familia 32, especialmente los organismos 2, 3 y 4 son quienes presentan el genotipo esperado. Para el caso de la familia 35, los organismos 1, 2 y 3 presentan el genotipo resultante de los padres. Los organismos 2, 3, 4 y 5 de la familia 52 presentan el genotipo característico relacionado con sus padres. En la familia 59 se observó solamente un organismo relacionado al genotipo de sus progenitores.

Con base a lo observado anteriormente, se procedió con la extracción de ADN de más organismos de las familias 32, 52 y 59, y fueron analizadas con el microsatélite CG49, que, como resultado, estos organismos si presentaron una relación de genotipos con los progenitores.

Como se observó anteriormente, en la familia 59 no se presentó un buen resultado. Por lo tanto, se sugiere la presencia de un alelo nulo en el genotipo de la progenitora de esta familia, es por ello que no se puede determinar su relación. Este problema puede solucionarse al analizar estas muestras utilizando otro *loci*.

Con el *loci* del microsatélite ucdCg06, se observó que la relación entre descendencia y progenitores es la esperada para todas las familias, determinando que existe un lazo parental.

Utilizando el microsatélite L10 para todas las muestras del día 30, los resultados mostraron que si existe relación entre progenitores y descendencia. Los resultados obtenidos con el microsatélite L48 determinó que existe relación genotípica entre progenitores y descendencia.

Sin embargo, en las familias 05 y 35, el organismo 5 no coincide con los padres, por lo tanto, estos se excluyen del análisis.

Con estos resultados se seleccionaron las muestras representativas de cada familia del muestreo al día cero y día 30, considerando 3 réplicas biológicas de un mismo linaje familiar.

7.6 Análisis transcriptómico entre familias termo-resistentes y termo-susceptibles

Los resultados de la extracción de ARN de los 36 individuos (18 del día cero y 18 del día 30) se presentan en la figura 7 y los resultados de concentración de los mismos se presentan en la tabla V. De acuerdo a la buena calidad y cantidad del ARN de las muestras de ARN se llevó a cabo construcción de las librerías.

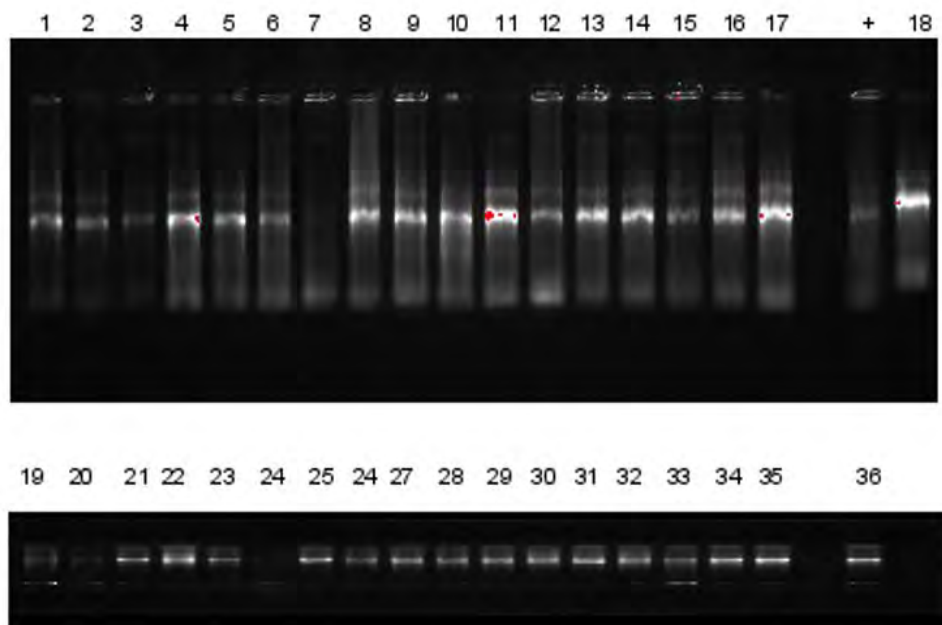


Figura 7. ARN en geles de agarosa de las muestras 1-36.

Tabla V. Concentración de ARN de las muestras

No. Muestra	ng/μl	No. Muestra	ng/μl
1	773.4	19	30.3
2	703.8	20	388.5
3	1103.4	21	640.4
4	1425.5	22	2139
5	955	23	598.6
6	735.2	24	871.12
7	88.1	25	838.9
8	1161.9	26	719.6
9	280.5	27	495.6
10	850.9	28	910.6
11	1141.7	29	685.7
12	337.9	30	1034
13	739	31	1264
14	228.7	32	1442.5
15	193	33	936.3
16	1206	34	572.7
17	1799.5	35	1062
18	1573	36	1130.6

El análisis del número de Integridad del ARN (RIN) no aplicó para este caso, ya que la proporción de ARN 18S y 28S es cero. En la figura 8 se observa un ejemplo de la intensidad del ARN 18S (A) y el análisis mediante electroforesis (B). Los resultados del análisis de ARN de las muestras estuvieron dentro de un mismo rango de calidad.

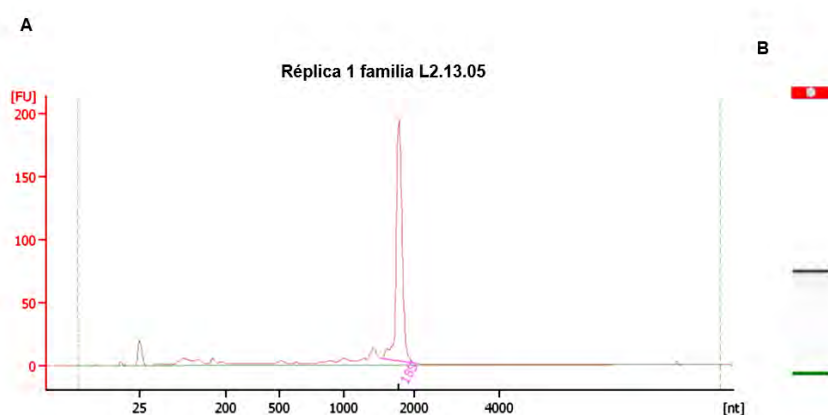


Figura 8. Análisis RIN de muestras de ARN. A: Gráfico de intensidad basado en ARN 18S; B: Electroforesis de microfluidos

7.7 Secuenciación RNA-Seq

Las 36 librerías secuenciadas tuvieron un promedio de 9,911,289 lecturas, de una longitud de 75 a 101 pb. Con la eliminación de las lecturas con valor de $Q < 30$, los adaptadores de secuenciación de Illumina y lecturas de baja calidad, se obtuvieron 8,343,285 secuencias totales por librería (Fig. 9).

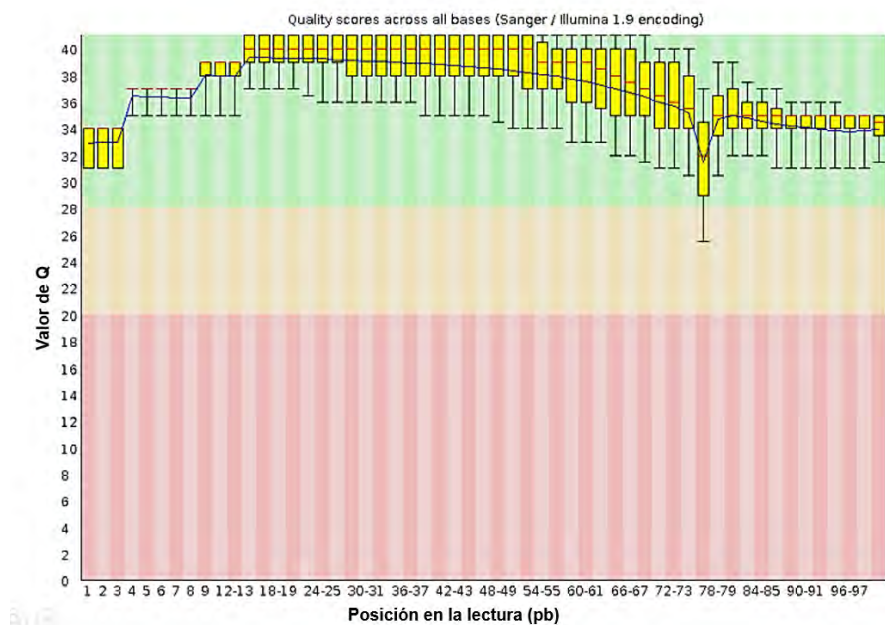


Figura 9. Calidad de lecturas (Q) en 100 pb

Por otra parte, en el ensamblaje con el programa StringTie, se observaron referenciados 28,628 ARNm en 28,605 *loci*. Estos transcritos aportan nueva información al genoma anotado, considerando las secuencias exónicas tipo *novel* debido a la variación de las isoformas expresadas (Tabla VI).

Tabla VI. Estadísticas de ensamble del transcriptoma con StringTie

Missed exon	0/189,465	0.0%
Novel exon	121,608/364,247	33.4%
Missed intron	0/160,837	0.0%
Novel introns	45,304/251,419	18.0%
Missed loci	0/28,605	0.0%
Novel loci	32,798/60,824	53.9%

7.8 Análisis de réplicas biológicas y expresión diferencial

Para corroborar la tendencia de las réplicas biológicas y de acuerdo con el análisis de componentes principales (Fig. 10), se corroboró que las réplicas de las familias se agrupan dentro de ellas, indicando que no presentan variación que pueda afectar los análisis de expresión diferencial.

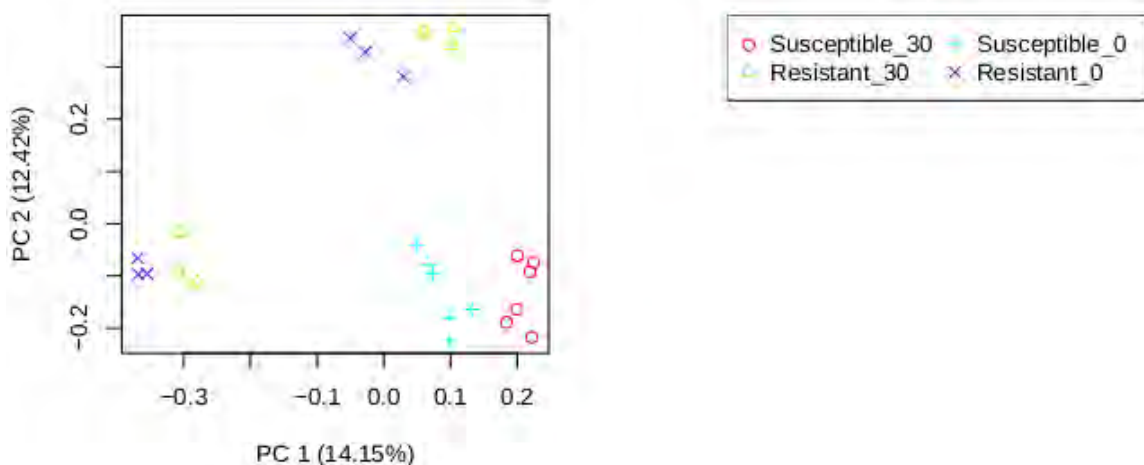


Figura 10. Análisis de componentes principales de las librerías de las seis familias muestreadas en el día cero y 30 días de exposición térmica

sub-regulados ($\log_{2}FC < 2$), con un valor de FDR menor a 0.02. Los resultados mostraron que para el día cero, se presentaron 1,822 transcritos sobre-regulados y 2,002 sub-regulados; para el día 30, se presentaron 2,660 transcritos sobre-regulados y 2,172 sub-regulados (Fig. 12).

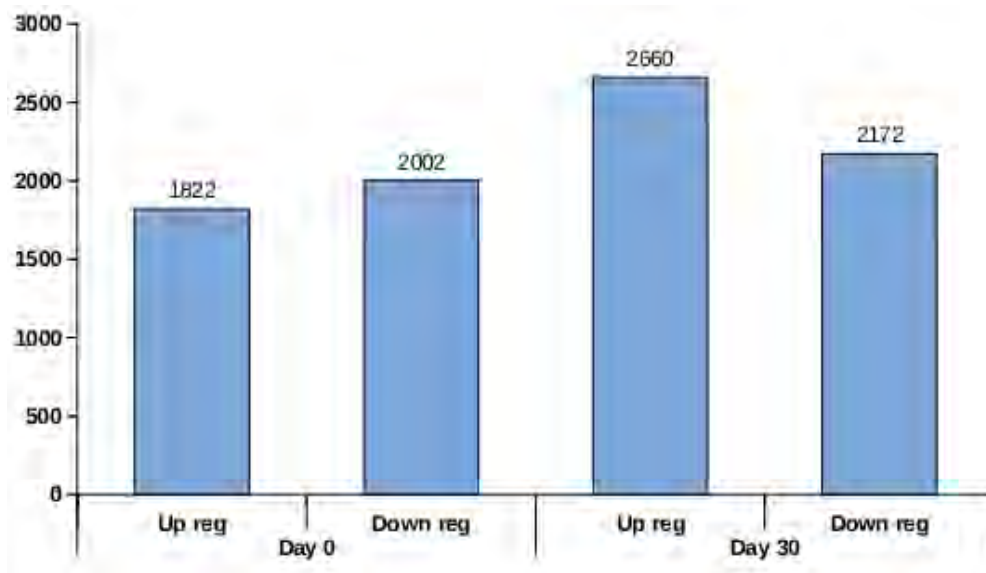


Figura 12. Número de transcritos sobre-regulados y sub-regulados entre fenotipos al día cero y al día 30

El número de transcritos sobre y sub-regulados indican que la temperatura está causando cambios transcripcionales significantes que serán clasificados de acuerdo a los términos ontológicos enriquecidos.

7.9 Anotación de transcritos expresados diferencialmente

Los transcritos sobre-regulados para fenotipos termo-tolerantes al día cero, presentaron las mayores interacciones entre las funciones moleculares (Fig. 13A) regulación de la transcripción y los factores de transcripción de la unión al ADN. En la clasificación de componente celular (Fig. 13B) se presentó la mayor interacción entre el organelo intracelular y unión a membrana, y los procesos celulares (Fig. 13C) con mayor interacción estuvieron relacionados con la respuesta a estrés y a estímulos.

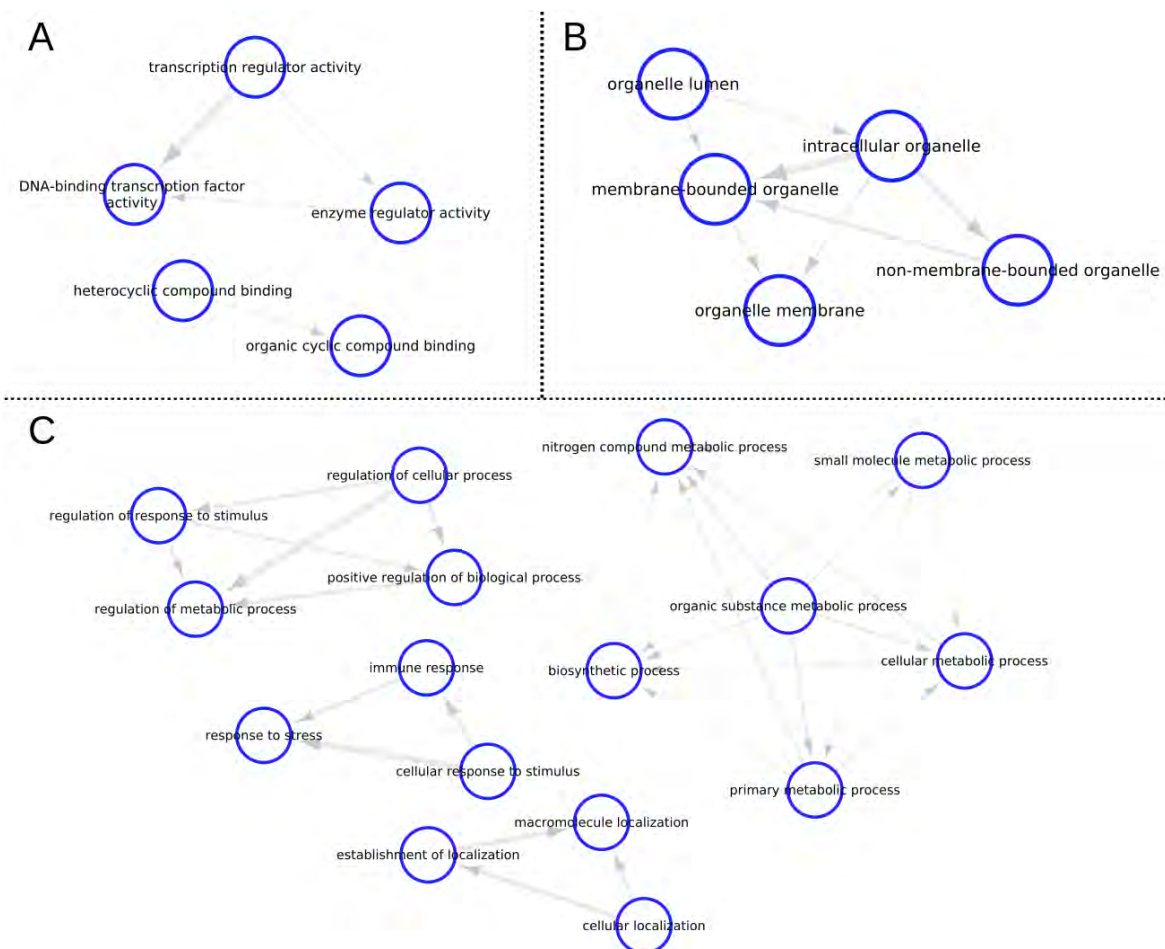


Figura 13. Enriquecimiento e interacción ontológica de los transcritos sobre-regulados entre fenotipos termo-resistente y termo-susceptible al día cero. A: Función molecular; B: Componente celular; C: Proceso biológico. El grosor de las flechas indica el nivel de interacción

Por otra parte, los términos ontológicos y las interacciones con mayor representación de los transcritos sub-regulados, fueron los mismos que para los términos ontológicos de los transcritos sobre-regulados (Fig. 14). Así mismo, de los transcritos más abundantes fueron aquellos relacionados con procesos de unión a ADN, indicando la respuesta asociada a la regulación de procesos sobre el procesamiento del ADN.

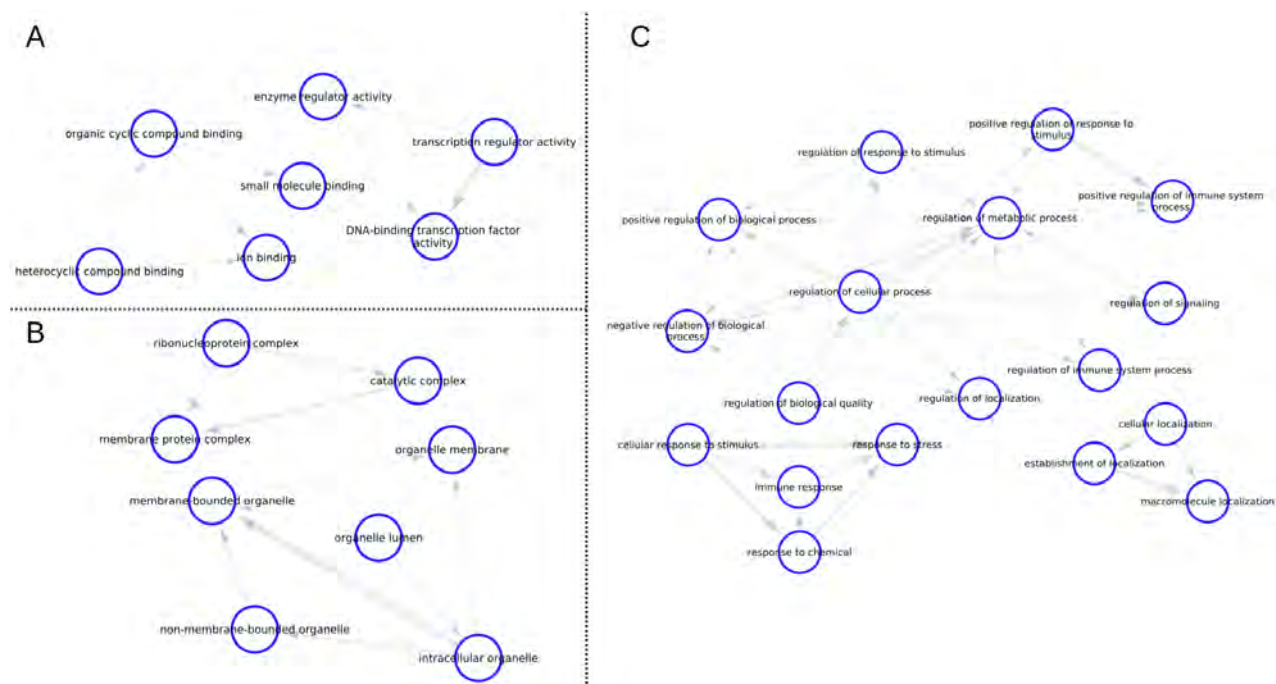


Figura 14. Enriquecimiento e interacción ontológica de los transcritos sub-regulados entre fenotipos termo-resistente y termo-susceptible al día cero. A: Función molecular; B: Componente celular; C: Proceso biológico. El grosor de las flechas indica el nivel de interacción.

Para el día 30 del experimento, las ontologías de los procesos mayormente representados de los transcritos diferencialmente expresados estuvieron relacionados con procesos de señalización, traducción de señales, respuesta a estímulos, procesos metabólicos primarios, procesos celulares, unión, actividad catalítica y partes de membrana. Los términos enriquecidos fueron similares para sobre (Fig. 15) y sub-expresados (Fig. 16), sin embargo, en los sobre-expresados se encontró el proceso biológico metilación. Las interacciones de términos enriquecidos fueron iguales que en los organismos del día cero, en donde las mayores interacciones fueron entre las funciones moleculares regulación de la transcripción y los factores de transcripción de la unión al ADN. En la clasificación de componente celular se presentó la mayor interacción entre el organelo intracelular y unión a membrana, y los procesos celulares (no se presenta figura porque es igual) con mayor interacción estuvieron relacionados con la respuesta a estrés y a estímulos.

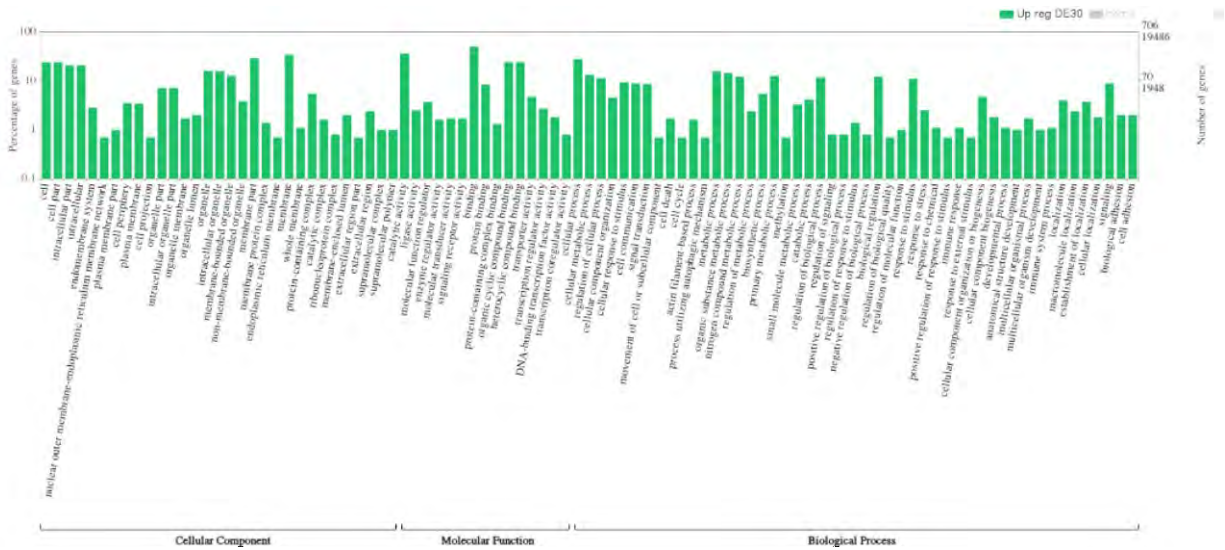


Figura 15. Enriquecimiento e interacción ontológica de los transcritos sobre-regulados entre fenotipos termo-resistente y termo-susceptible al día 30

Los ostiones del día 30 presentaron transcritos sub-regulados con las mismas ontologías enriquecidas y con las mismas interacciones que los genes sobre-regulados en las funciones moleculares y en la clasificación de componente celular, la mayor interacción estuvo relacionada con la respuesta a estrés y con estímulos (Fig. 16).

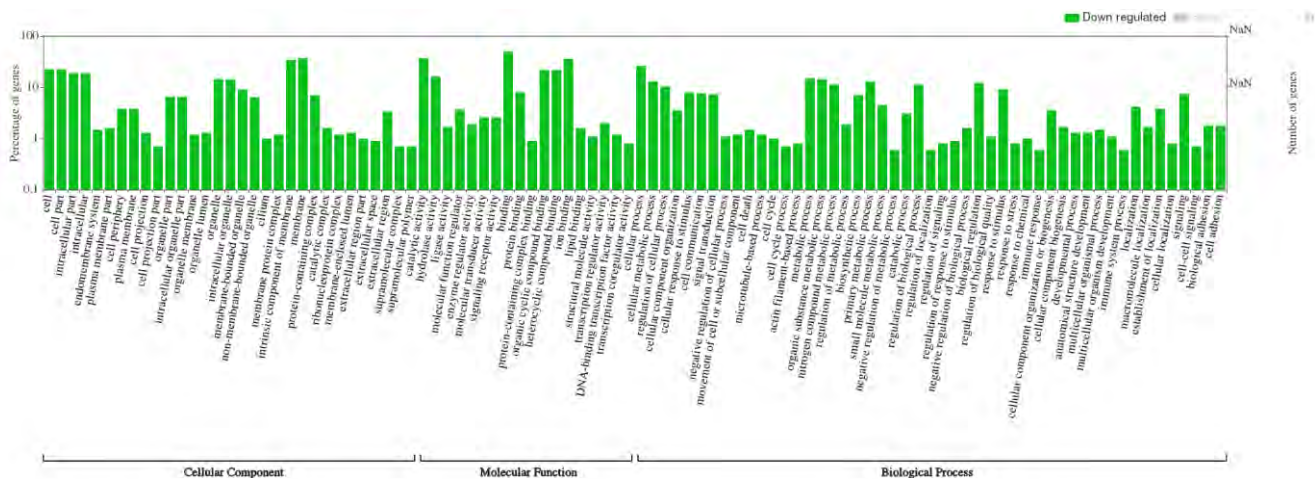


Figura 16. Ontología de transcritos sub-regulados entre fenotipos termo-resistente y termo-susceptible al día 30. A: Función molecular; B: Componente celular; C: Proceso biológico. El grosor de las flechas indica el nivel de interacción.

Por otra parte, los transcritos diferencialmente expresados entre fenotipos en el día cero y día 30 fueron comparados en un diagrama de Venn, obteniendo 432 transcritos sobre-regulados entre fenotipos que se conservan sobre-regulados en el día cero y en el día 30. Y se encontraron 472 transcritos sub-regulados que fueron conservados también durante todo el experimento (Fig. 17). Los genes sobre-regulados son del fenotipo termo-resistente y los sub-regulados hacen referencia al fenotipo termo-susceptible. Por lo tanto, se cuenta con 432 transcritos diferenciados y exclusivos para resistentes, y 472 para susceptibles. Sin embargo, Para la obtención de candidatos para genes marcadores para la identificación de fenotipos, fue necesario realizar el análisis más estricto en función de la diferenciación con un valor de $FC > 4$ para sobre-regulados y un $FC < 4$ para los sub-regulados (Fig. 18).

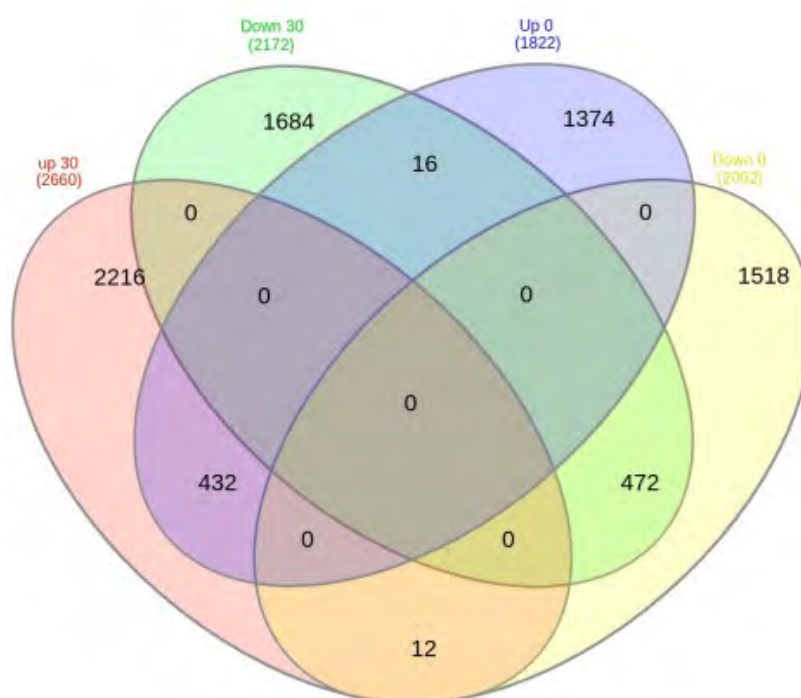


Figura 17. Transcritos sobre-regulados (Up) y sub-regulados (Down) diferencialmente expresados (sobre-regulados = $FC > 2$ y sub-regulados = $FC < -2$) entre fenotipos al día cero y 30 del reto térmico oscilatorio

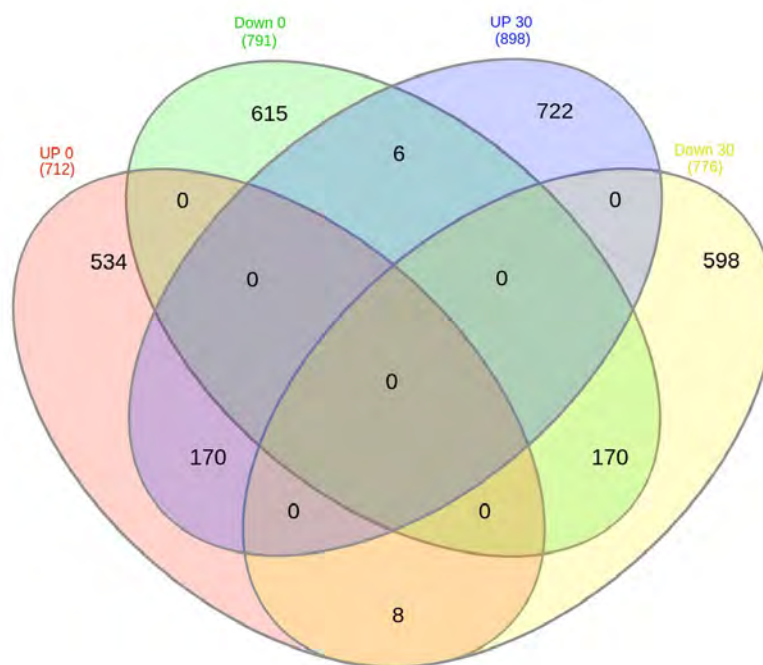


Figura 18. Transcritos sobre-regulados (Up) y sub-regulados (Down) diferencialmente expresados (sobre-regulados = $FC > 4$ y sub-regulados = $FC < -4$) entre fenotipos al día cero y 30 del reto térmico oscilatorio

Con este resultado, se obtuvieron 170 transcritos conservados en cada fenotipo. Con base a lo anterior, considerando el orden de análisis, los transcritos sobre-regulados hacen referencia al fenotipo termo-resistente, de la misma manera, los transcritos sub-regulados corresponden al fenotipo termo-susceptible. Por lo tanto, se consideran 170 transcritos sobre-regulados como marcadores para identificación de fenotipo termo-resistente y 170 para fenotipo termo-susceptible.

Los transcritos considerados como marcadores para termo-resistentes estuvieron mayormente relacionados con procesos biológicos de tipo metabólico y celular, componentes celulares como estructura anatómica intracelular, componente de membrana intrínseco, organelos intracelulares y partes de membrana. Las funciones moleculares se relacionaron con procesos de unión a iones, a compuestos orgánicos cíclicos y unión a compuestos heterocíclicos. Los transcritos que representaron estas funciones se muestran en la tabla VII.

Tabla VII. Anotación de transcritos marcadores para fenotipo termo-resistente.

Gen ID	UniProt ID	Nombre de proteína	Ontología de genes
CGI_10001257	K1PEP3	Uncharacterized protein	
CGI_10001258	K1PLF6	Uncharacterized protein (Fragment)	
CGI_10001397	K1PLC1	Tripartite motif-containing protein 3	
CGI_10028579	K1QAB5	Fibrinogen alpha-2 chain (Fragment)	
CGI_10006287	K1Q717	Uncharacterized protein	
CGI_10012099	K1Q634	Retinol dehydrogenase 2	GO:0004222; GO:0016020; GO:0016491
CGI_10027458	K1Q5P7	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) (EC 5.2.1.8)	GO:0003755
CGI_10024245	K1PY30	Septin-2	GO:0005525
CGI_10019184	K1S1Y8	Collectin-12	
CGI_10019185	K1QWM2	Uncharacterized protein	
CGI_10002387	K1Q4A5	Heat shock 70 kDa protein 12B	GO:0005524; GO:0016887
CGI_10010661	K1QAC4	CCHC-type domain-containing protein	GO:0003676; GO:0008270
CGI_10008064	K1Q269	Krev interaction trapped protein 1	GO:0005856
CGI_10013849	K1Q8L9	Eukaryotic translation initiation factor 5	GO:0003743; GO:0005525
CGI_10013791	K1QF77	Uncharacterized protein	
CGI_10009190	K1Q0Q3	Uncharacterized protein	
CGI_10026771	K1RI17	Apoptosis 2 inhibitor	GO:0046872
CGI_10026772	K1S1N1	Apoptosis 1 inhibitor	
CGI_10026795	K1QWE6	DUF4806 domain-containing protein	
CGI_10026796	K1R625	Uncharacterized protein	
CGI_10004755	K1Q6Y3	MIEAP domain-containing protein	
CGI_10013046	K1PWQ9	Cytoplasmic FMR1-interacting protein	GO:0016021; GO:0030833; GO:0031267
CGI_10013047	K1Q418	Cytoplasmic FMR1-interacting protein 2	GO:0030833; GO:0031267
CGI_10012376	K1PNT7	Dynamin-1	GO:0003924; GO:0005525
CGI_10025593	K1RA93	Uncharacterized protein	GO:0000407; GO:0005776; GO:0008270; GO:0016236; GO:0043130
CGI_10016401	K1Q6C7	Uncharacterized protein	GO:0004252; GO:0005044; GO:0016020
CGI_10016402	K1QS70	Enteropeptidase	GO:0016021
CGI_10016403	K1PK89	Uncharacterized protein	GO:0016021
CGI_10006428	K1PIW0	Uncharacterized protein	
CGI_10007185	K1PPT1	Uncharacterized protein	
CGI_10018687	K1R9K5	Fibrinogen C domain-containing protein 1	GO:0016021
CGI_10013340	K1PWBO	Fibropellin-1	GO:0005509
CGI_10013341	K1Q367	Fibropellin-1	GO:0005509
CGI_10013342	K1QP38	Fibropellin-1	GO:0005509
CGI_10027862	K1R389	Transcriptional repressor protein YY1	GO:0005634
CGI_10016634	K1QSQ0	Uncharacterized protein	
CGI_10019135	K1R5S6	Spermine oxidase	GO:0016491
CGI_10028091	K1R4M4	E3 ubiquitin-protein ligase DZIP3	
CGI_10028092	K1RB69	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (Fragment)	GO:0008270; GO:0008745; GO:0009253; GO:0042834; GO:0045087
CGI_10001309	K1PG42	E3 ubiquitin-protein ligase DZIP3	
CGI_10001667	K1QM32	Uncharacterized protein	
CGI_10002553	K1QKL2	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme ATG7 (Autophagy-related protein 7)	GO:0000407; GO:0006914; GO:0008641; GO:0015031
CGI_10003431	K1PD19	Uromodulin	
CGI_10003516	K1QJ62	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator chromatin subfamily E member 1	GO:0016514; GO:0043044
CGI_10003641	K1QJ34	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 12	
CGI_10004069	K1PXX6	Stimulator of interferon genes protein	GO:0000166; GO:0002218; GO:0007165; GO:0032481
CGI_10005605	K1PWI6	Apoptosis regulator R1	GO:0006915; GO:0016020; GO:0042981
CGI_10005665	K1PP91	Uncharacterized protein	
CGI_10005666	K1PWG3	Cohesin subunit SA-1	
CGI_10018801	K1R7E4	Tubulin polyglutamylase complex subunit 2 (Fragment)	GO:0018095
CGI_10006408	K1PF93	Matrin-3	GO:0003676; GO:0005634; GO:0008270
CGI_10006611	K1QF88	HEPN_DZIP3 domain-containing protein	
CGI_10023113	K1RRA8	Tetratricopeptide repeat protein 25	
CGI_10027074	K1QT90	Uncharacterized protein	
CGI_10010551	K1P5E0	5-methyltetrahydrofolate--homocysteine methyltransferase (EC 2.1.1.13) (Vitamin-B12 dependent methionine synthase)	GO:0008270; GO:0008705; GO:0016021; GO:0031419; GO:0032259; GO:0042558
CGI_10015044	K1QZQ7	Collagen alpha-2(VIII) chain	GO:0005581
CGI_10024690	K1QZE0	Maleylacetoacetate isomerase	GO:0016853
CGI_10007247	K1R4K0	Uncharacterized protein	GO:0016021
CGI_10011199	K1QPM4	Uncharacterized protein	GO:0016021
CGI_10015975	K1RMI1	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase beta	GO:0005001
CGI_10006673	K1RMA1	Tenascin-R	
CGI_10018749	K1QMN6	Uncharacterized protein	
CGI_10003700	K1R0J3	Tyrosine-protein kinase RYK	GO:0004672; GO:0005524; GO:0016021
CGI_10023426	K1QKH0	Caspase-7	GO:0004197; GO:0005737; GO:0006915
CGI_10023427	K1QSW8	Caspase-7	GO:0004197; GO:0005737; GO:0006915
CGI_10011645	K1RFC1	Melatonin-related receptor	GO:0004930; GO:0016021
CGI_10021151	K1QF48	Uncharacterized protein	
CGI_10011247	K1RE53	Uncharacterized protein	

En el caso de los transcritos marcadores para termo-susceptibles, los 170 sub-regulados enriquecieron los términos de tipo proceso biológico como: procesos metabólicos celulares, procesos metabólicos de sustancias orgánicas y procesos metabólicos de compuestos nitrogenados; componentes celulares como: organelos no ligados a membrana, componentes de membrana intrínsecos y partes de membrana; funciones moleculares como: unión a compuestos heterocíclicos y unión a compuestos orgánicos cíclicos. Estos términos ontológicos fueron primordialmente representados por los transcritos mostrados en la tabla VIII.

Tabla VIII. Anotación de transcritos marcadores para fenotipo termo-susceptible

Gene ID	UniProt ID	Nombre de proteína	Ontología de genes
CGI_10000596	K1PFF6	Glycoprotein 3-alpha-L-fucosyltransferase A	GO:0006486; GO:0008417; GO:0016021; GO:0032580
CGI_10022503	K1Q390	Uncharacterized protein	
CGI_10022042	K1RD93	Myosin-XV	GO:0003774; GO:0003779; GO:0005524; GO:0005737; GO:0007605; GO:0016459
CGI_10017830	K1Q9A5	Insulin-degrading enzyme	GO:0008237; GO:0046872
CGI_10004767	K1QMU9	Transmembrane and coiled-coil domains protein 1	GO:0005262; GO:0030176; GO:0032469
CGI_10000281	K1QBV5	Cytochrome b(558) alpha chain (Cytochrome b-245 light chain) (Cytochrome b558 subunit alpha) (Neutrophil cytochrome b 22 kDa polypeptide) (Superoxide-generating NADPH oxidase light chain subunit) (p22 phagocyte B-cytochrome) (p22-phox)	GO:0005886; GO:0016021; GO:0020037
CGI_10019476	K1Q2S4	ANK_REP_REGION domain-containing protein	
CGI_10017319	K1PUK4	Uncharacterized protein	
CGI_10023930	K1PU32	Glutathione gamma-glutamylcysteinyltransferase (EC 2.3.2.15)	GO:0010038; GO:0016756; GO:0046872; GO:0046938
CGI_10001843	K1Q170	Heparanase	GO:0016020; GO:0016798
CGI_10008351	K1PSX9	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase kappa	GO:0004725
CGI_10004191	K1PZZ2	GTPase IMAP family member 4	GO:0005525
CGI_10003288	K1Q773	Collagen alpha-5(VI) chain	GO:0005581
CGI_10025294	K1R5L4	Kelch-like protein 24	
CGI_10025310	K1S180	Differentially expressed in FDCP 8-like protein A	GO:0035556; GO:0046872
CGI_10012073	K1R089	Uncharacterized protein	
CGI_10012074	K1PS73	Thrombospondin-2	
CGI_10004755	K1Q6Y3	MIEAP domain-containing protein	
CGI_10028605	K1RB54	Uncharacterized protein	
CGI_10010756	K1QYN4	D-amino-acid oxidase 2	GO:0003884; GO:0046416; GO:0071949
CGI_10027173	K1PPQ8	Uncharacterized protein	GO:0016021
CGI_10014323	K1PW66	Transient receptor potential cation channel subfamily M member 3	GO:0005216; GO:0016021
CGI_10018627	K1RAK5	Aquaporin-8	GO:0015267; GO:0016021
CGI_10018628	K1RGW0	Aquaporin-8	GO:0015267; GO:0016021
CGI_10013525	K1RZR1	Heat shock 70 kDa protein 12A	GO:0005524; GO:0016887
CGI_10013526	K1QUG8	CARD domain-containing protein	GO:0042981
CGI_10014804	K1Q020	SWIM-type domain-containing protein	GO:0008270
CGI_10001634	K1PZX6	Tripartite motif-containing protein 2	GO:0008270
CGI_10004347	K1PK81	Uncharacterized protein	
CGI_10004348	K1PRX6	Heat shock 70 kDa protein 12A	GO:0005524; GO:0016887
CGI_10007147	K1PK69	Uncharacterized protein	
CGI_10010266	K1PRL5	Gastric triacylglycerol lipase	
CGI_10014390	K1Q5R9	Tripartite motif-containing protein 3	GO:0008270
CGI_10014250	K1PJ45	Cytochrome P450 3A9	GO:0004497; GO:0005506; GO:0016705; GO:0020037
CGI_10014251	K1PQV2	Cytochrome P450 3A24	GO:0004497; GO:0005506; GO:0016705; GO:0020037
CGI_10014252	K1PY43	Roundabout-like protein 3	GO:0016021
CGI_10025109	K1QRU8	Myosin heavy chain, striated muscle	GO:0003774; GO:0005524; GO:0016459; GO:0030016; GO:0051015
CGI_10025110	K1R1B3	Myosin heavy chain, striated muscle	GO:0016459; GO:0030016
CGI_10016567	K1QPP5	Uncharacterized protein	
CGI_10001559	K1PLY9	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase eta	GO:0004725
CGI_10001570	K1PUT1	Uncharacterized protein	
CGI_10001931	K1PLN0	Megakaryocyte-associated tyrosine-protein kinase	GO:0004672; GO:0005524
CGI_10002101	K1PUF3	Collagen alpha-2(VIII) chain	GO:0005581
CGI_10002102	K1Q162	Collagen alpha-2(VIII) chain	GO:0005581
CGI_10002259	K1Q0W0	Exonuclease domain-containing protein	GO:0003676
CGI_10002260	K1QL79	Uncharacterized protein	
CGI_10002291	K1PU47	Uncharacterized protein	
CGI_10009708	K1R347	Tetrapeptide repeat protein 38	
CGI_10019409	K1R918	Uncharacterized protein	
CGI_10002636	K1Q065	Uncharacterized protein	
CGI_10002862	K1PZU1	Hsc70-interacting protein	
CGI_10012692	K1RT25	NAD-dependent deacetylase sirtuin-2	GO:0016740; GO:0070403
CGI_10003264	K1QJG5	ADAM 17-like protease	GO:0004222; GO:0016021
CGI_10003546	K1PYR8	Lachesin	
CGI_10003547	K1QJ70	Lachesin	
CGI_10003670	K1PCU3	Pyruvate kinase isozymes R/L	GO:0000287; GO:0004743; GO:0016301; GO:0030955
CGI_10003671	K1PJ46	Pyruvate kinase (EC 2.7.1.40)	GO:0000287; GO:0004743; GO:0005524; GO:0016301; GO:0030955
CGI_10023241	K1QKQ7	Endo-1,3(4)-beta-glucanase (EC 3.2.1.6)	GO:0008152; GO:0052861; GO:0052862
CGI_10023242	K1QUK9	Migration and invasion-inhibitory protein	GO:0010972; GO:0030336
CGI_10018579	K1R1A0	Tripartite motif-containing protein 3	
CGI_10005101	K1PH68	Uncharacterized protein	
CGI_10005126	K1PAQ4	Myosin-Vb (Fragment)	GO:0003774; GO:0005524; GO:0016459; GO:0051015
CGI_10005317	K1PAH9	Uncharacterized protein	
CGI_10006280	K1PFB7	DnaJ-like protein subfamily B member 3	
CGI_10006786	K1PEZ3	Tripartite motif-containing protein 3	
CGI_10007437	K1PE18	Uncharacterized protein	
CGI_10007687	K1P7T1	Uncharacterized protein	GO:0003676; GO:0016021
CGI_10007992	K1PTD1	IgGfC-binding protein	GO:0016021
CGI_10007993	K1QDU2	Ficolin-2	GO:0016021
CGI_10008443	K1QD23	Acetyl-CoA acetyltransferase B, mitochondrial	GO:0016747
CGI_10023095	K1QTF6	SEA domain-containing protein	GO:0016021
CGI_10009359	K1PJY6	Uncharacterized protein	
CGI_10011415	K1PIK1	Heat shock 70 kDa protein 12B	GO:0005524; GO:0016887
CGI_10011417	K1QB06	Heat shock 70 kDa protein 12B	GO:0005524; GO:0016887
CGI_10024694	K1QSB4	Basal body-orientation factor 1 (Coiled-coil domain-containing protein 176)	GO:0005737; GO:0036064
CGI_10018344	K1QP79	Uncharacterized protein	
CGI_10018365	K1QFR0	Fibrocystin-L	GO:0017154
CGI_10009494	K1QE52	Neurogenic locus notch-like protein 3	GO:0005509
CGI_10008917	K1QK37	Multiple epidermal growth factor-like domains 6	
CGI_10014958	K1QZ84	Thioredoxin domain-containing protein 3-like protein	GO:0004550; GO:0006183; GO:0006228; GO:0006241; GO:0007155; GO:0030246
CGI_10017851	K1QRV5	C1q domain-containing protein	
CGI_10022224	K1RGJ3	Uncharacterized protein	
CGI_10006091	K1QVH3	Uncharacterized protein	

7.10 Metilación global entre familias termo-resistentes y termo-susceptibles

Se procesaron un promedio de 55'088,998 secuencias con 30X de cobertura, de las cuales, 18'000,000 se alinearon al metiloma, y 17'000,000 secuencias presentaron alineamientos únicos. Los resultados de metilaciones en el genoma se observaron en contextos CpG, CHG y CHH (donde H corresponde a A, T o C), obteniendo la metilación global en un porcentaje de 0.13 a 0.16% para CpG, 0–0.01% para CHG, y 0–0.01% para CHH, siendo mayor el porcentaje de metilación en contexto CpG en todas las muestras analizadas (Tabla IX).

Tabla IX. Reporte de alineamiento y porcentajes de metilación global en las réplicas de las familias termo-resistentes y termo-susceptibles

Familias	S05			S35			R52			R59		
Lecturas totales	61878365	55341307	53774339	52957473	55987014	52686539	52999177	48806382	55578530	65202267	57791009	48065569
Lecturas alineadas	19918402	18259616	17310264	18101215	18861747	16752211	17764522	16555796	17569314	21656200	19650249	16585054
Lecturas no alineadas	37804360	33353133	32803700	31161157	33229115	32394424	31660428	28858671	34248909	39131118	34146275	28287600
Lecturas alineadas ambiguamente	4154586	3727581	3659426	3694150	3895186	3539026	3573353	3391053	3759343	4413819	3993409	3191985
Secuencias no genómicas	1017	977	949	951	966	878	874	862	964	1130	1076	930
Lecturas duplicadas (removidas)	1353527	1006687	896430	876138	914814	722040	908652	756117	1080107	1242354	1100361	739692
Lecturas unicas	18564875	17252929	16413834	17225077	17946933	16030171	16855870	15799679	16489207	20413846	18549888	15845362
Total Cs	553945592	524606363	487154916	508056903	542747259	486129855	467933026	488812284	488083848	620830657	577577032	511927614
CpGs metiladas	10111611	8801527	9196141	8508180	9245374	8431448	7390697	7741705	8754505	11223169	9490397	8612865
CpGs no metiladas	56266778	53348365	48057002	51564844	55363102	48995755	46808235	51074109	48771019	63995153	59152917	53367973
CHGs metiladas	493939	465055	448720	421481	451970	418377	256155	397816	453808	523014	469128	776435
CHGs no metiladas	91174813	86409235	79399330	83088994	89344515	79746615	74726091	81130624	79681059	102850662	95445227	84823979
CHHs metiladas	2209304	2051881	2067216	1838555	1966070	1833682	1149105	1672253	2082092	2232970	2013026	3342351
CHHs no metiladas	393689147	373530300	347986507	362634849	386376228	346703978	337602743	346795777	348341365	440005689	411006337	361004011

Los porcentajes de metilación global en contexto CpG fueron entre 14.01 y 15.15, pero no se presentaron diferencias significativas ($P = 0.188$) entre fenotipos, y tampoco entre familias ($P = 0.508$) (Tabla X), por lo tanto se continuó analizando las diferencias de metilación por regiones del gen (promotores, intrones, exones).

Tabla X. Porcentajes promedio de metilación en CpG por familia dentro de fenotipo

% De CpG metiladas	Familias			
	Termo-resistentes		Termo-susceptibles	
	RR52	RR59	SS05	SS35
	14.01	14.22	15.15	14.38

7.9.1 Regiones diferencialmente metiladas (DMR) entre fenotipos termo-resistente y termo-susceptible de *C. gigas*

Con los resultados obtenidos del análisis de metilación global en contexto CpG, incluso si no hay diferencias significativas, se encontraron regiones potencialmente metiladas (DMR) en el fenotipo resistente, con un total de 3,672 DMR en promotores (definidos como 1 Kb río arriba del marco de lectura), 6,340 en exones y 18,685 en intrones. Sin embargo, las DMR hipermetiladas entre fenotipos se localizaron en dos promotores, 23 exones y 122 intrones, mientras que las DMR hipometiladas fueron localizadas en un promotor, tres exones y 10 intrones en el fenotipo termo-resistente (Tabla XI).

Tabla XI. Número de regiones hiper e hipo-metilaciones diferenciales entre fenotipos de *C. gigas*

Metilaciones	Promotores	Exones	Intrones
DMR potenciales	3672	6340	18685
DMR hipermetilados	2	23	122
DMR hipometilados	1	3	10

El análisis ontológico indicó que las DMR estuvieron relacionadas con genes codificantes para componentes celulares como parte de la membrana, complejos que contienen proteínas y organelos. En las funciones moleculares se observaron procesos de unión, actividad catalítica, y transporte activo. Por otra parte, los procesos biológicos con DMR hipermetiladas estuvieron relacionadas con procesos celulares y metabólicos, componentes de organización celular, localización y señalización (Fig. 19).

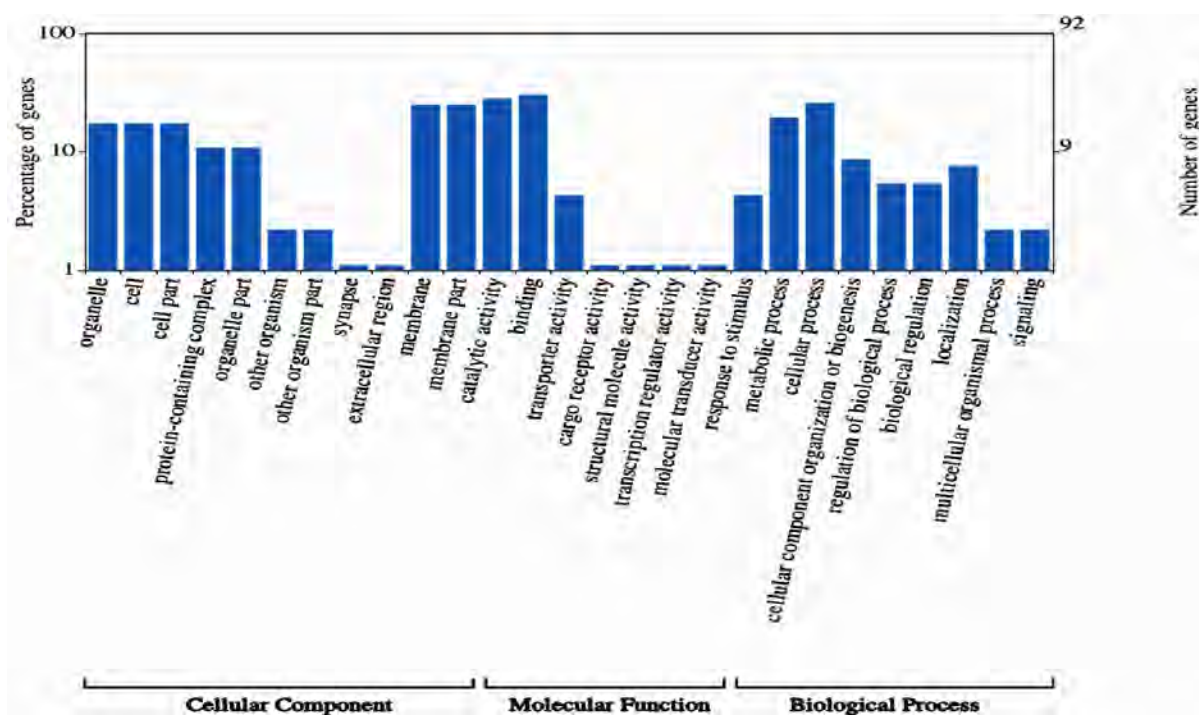


Figura 19. Caracterización de ontología de genes del total de DMR hipermetiladas y comparadas entre fenotipos

7.9.2 DMR hiper e hipometiladas en promotores de genes de familias con fenotipo termo-resistente

Las dos DMR hipermetiladas en promotores del fenotipo termo-resistente, se asignaron a los genes: *Dynactin subunit 4* (CGI_10028753, GO:0005869) y *Zinc finger MYND domain-containing protein 19* (CGI_10028933, GO:0046872). El único promotor hipometilado se localizó en el gen codificante para *cellular component transmembrane protein 185A* (CGI_10028617, GO:0016021).

7.9.3 Exones con DMR hiper o hipometiladas en ostiones del fenotipo termo-resistente

Los 23 DMR hipermetilados localizados en exones de ostiones del fenotipo termo-resistente, se asignaron a 18 genes (Tabla XII). Seis de estos están involucrados en procesos como interacción de unión, dos genes con función de componentes de membrana, tres con funciones ribosomales, uno con función de estructura constituyente del poro nuclear (Fig. 20), y seis hiper-DMR no tuvieron anotación. Los exones hipometilados para el fenotipo termo-resistente son: *solute carrier family 35 member F5* (CGI_10028548, GO:0016021), *DNA replication licensing*

factor *MCM9* (CGI_10027394, GO:0003677, GO:0005524, GO:0006270), y *Ran-binding protein 9* (CGI_10027816).

Tabla XII. Ontología de genes hiper e hipometilados en exones de *C. gigas* termo-resistentes

Proceso	Nombre de la proteína	Ontología			ID
		Función molecular	Componente celular	Proceso biológico	
Hipermetilado					
Binding proteins	Heterochromatin protein 1-binding protein 3	Chromatin binding [GO:0003682]; DNA binding [GO:0003677]	Nucleosome [GO:000786]; nucleus [GO:0005634]	Heterochromatin organization [GO:0070828]; nucleosome assembly [GO:0006334]; regulation of transcription, DNA-templated [GO:0006355]	CGI_10028772
	Cytadherence high molecular weight protein 2	Chitin binding [GO:0008061]	Extracellular region [GO:0005576]; integral component of membrane [GO:0016021]	Chitin metabolic process [GO:0006030]	CGI_10027082
	Cytosolic purine 5'-nucleotidase	Metal ion binding [GO:0046872]	-	-	CGI_10027233
	NEDD4-binding protein 2	-	-	-	CGI_10028574
	ATP-binding cassette sub-family F member 3	ATPase activity [GO:0016887]; ATP binding [GO:0005524]	-	-	CGI_10027843
Component of membrane	Transcriptional regulator ATRX	ATP binding [GO:0005524]; DNA binding [GO:0003677]; metal ion binding [GO:0046872]	Nucleosome [GO:000786]	Nucleosome assembly [GO:0006334]	CGI_10027273
	Magnesium transporter NIPA2	Magnesium ion transmembrane transporter activity [GO:0015095]	Integral component of membrane [GO:0016021]	-	CGI_10026908
Ribosome function	MAGUK p55 subfamily member 5	-	-	Bicellular tight junction assembly [GO:0070830]; establishment of epithelial cell polarity [GO:0090162]	CGI_10026838
	Ribosome production factor 1	-	-	-	CGI_10027972
	28S ribosomal protein S27, mitochondrial	-	Ribosome [GO:0005840]	-	CGI_10027880
Nucleus	Queuine tRNA-ribosyltransferase subunit QTRTD1	Transferase activity, transferring pentosyl groups [GO:0016763]	-	tRNA modification [GO:0006400]	CGI_10027676
	Uncharacterized protein	Structural constituent of nuclear pore [GO:0017056]	Nuclear pore [GO:0005643]	-	CGI_10028193
Hipometilado					
Component of membrane	Solute carrier family 35 member F5	-	Integral component of membrane [GO:0016021]	-	CGI_10028548
Binding process	Dna replication licensing factor MM9	ATP binding [GO:0005524]; DNA binding [GO:0003677]	-	DNA replication initiation [GO:0006270]	CGI_10027394

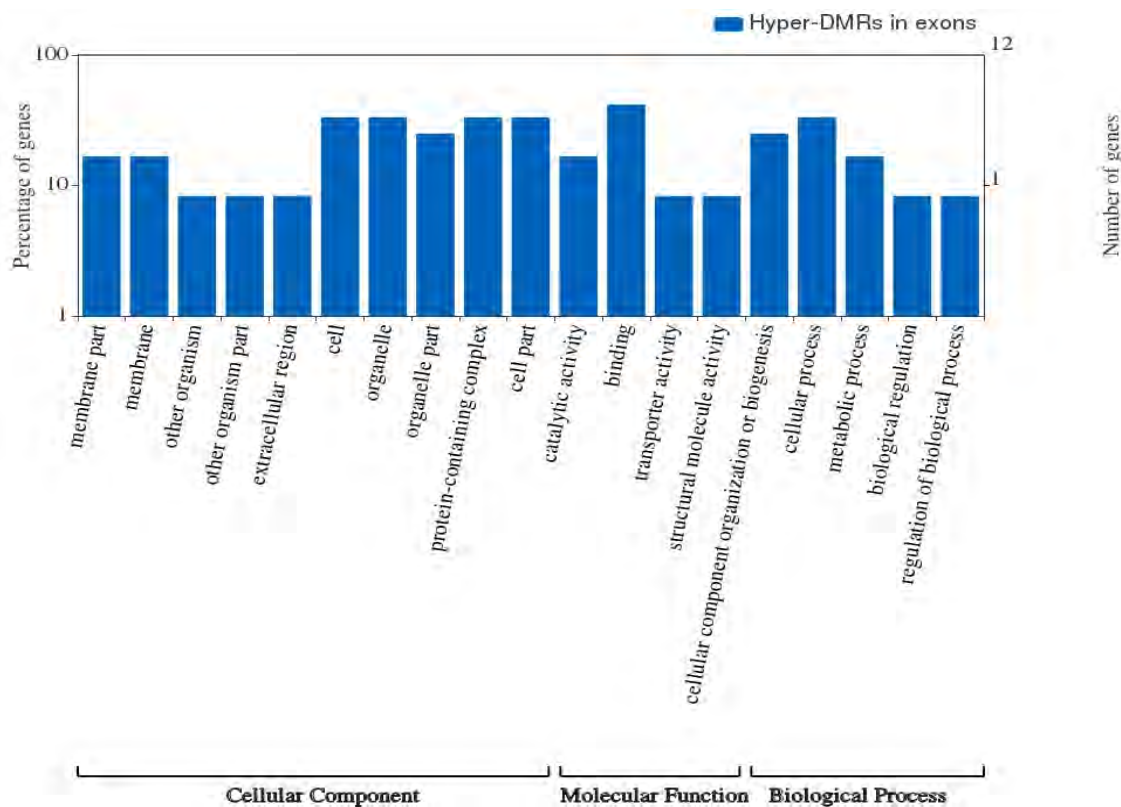


Figura 20. Ontología de genes que presentan DMR hipermetilado en ostiones de fenotipo termo-resistente.

7.9.4 Intrones con DMR hiper o hipometiladas en ostiones del fenotipo termo-resistente

De los intrones que presentaron DMR hipermetiladas en el fenotipo resistente (Fig. 21), 28 se relacionaron con procesos de unión (Tabla XIII), y 22 genes con anotación de componente celular (Tabla XIV). La función molecular de estos genes (Tabla XV) es de proteínas mitocondriales, dos genes identificados con función de actividad transferasa, dos genes con función de actividad de hidrolasa, tres genes involucrados en la división celular, otros relacionados con reparación del ADN, actividad sintasa y oxidorreductasa, (Fig. 21), y 24 genes no tuvieron anotación.

Tabla XIII. Anotación y ontología de los DMR hipermetilados con procesos de unión en intrones del fenotipo termo-resistente de *C. gigas*

Proceso	Nombre de proteína	Ontología de genes			ID
		Función molecular	Componente celular	Proceso biológico	
Binding process	Signal transducer and activator of transcription 6	DNA-binding transcription factor activity [GO:0003700]	Nucleus [GO:0005634]	Signal transduction [GO:0007165]	CGI_10028719
	Testican-1	Calcium ion binding [GO:0005509]	-	-	CGI_10028770
	Mitochondrial Rho GTPase (EC 3.6.5.-)	Calcium ion binding [GO:0005509]; GTPase activity [GO:0003924]; GTP binding [GO:0005525]	Integral component of mitochondrial outer membrane [GO:0031307]	Mitochondrion organization [GO:0007005]	CGI_10028781
	Phosphotyrosine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase	DNA binding [GO:0003677]; phosphatase activity [GO:0016791]	Nucleus [GO:0005634]	-	CGI_10028818
	C2H2-type domain-containing protein	Nucleic acid binding [GO:0003676]; zinc ion binding [GO:0008270]	-	-	CGI_10028489
	Pyridoxine-5'-phosphate oxidase	FMN binding [GO:0010181]; pyridoxamine-phosphate oxidase activity [GO:0004733]	-	Pyridoxine biosynthetic process [GO:0008615]	CGI_10028532
	DnaJ-like protein subfamily B member 11	Unfolded protein binding [GO:0051082]	Collagen trimer [GO:0005581]	Protein folding [GO:0006457]	CGI_10028542
	La-related protein 7	RNA binding [GO:0003723]	Nucleus [GO:0005634]; ribonucleoprotein complex [GO:1990904]	RNA processing [GO:0006396]	CGI_10027707
	Dopamine beta-hydroxylase	Copper ion binding [GO:0005507]; oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen, reduced ascorbate as one donor, and incorporation of one atom of oxygen [GO:0016715]	-	-	CGI_10027734
	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1	Kinase activity [GO:0016301]; magnesium ion binding [GO:0000287]; ribose phosphate diphosphokinase activity [GO:0004749]	-	Nucleoside metabolic process [GO:0009116]; nucleotide biosynthetic process [GO:0009165]; ribonucleoside monophosphate biosynthetic process [GO:0009156]	CGI_10027756
	LIM domain only protein 7	Metal ion binding [GO:0046872]	-	-	CGI_10027758
	Serine/threonine-protein phosphatase (EC 3.1.3.16)	Calcium ion binding [GO:0005509]; iron ion binding [GO:0005506]; manganese ion binding [GO:0030145]; phosphoprotein phosphatase activity [GO:0004721]	-	Detection of stimulus involved in sensory perception [GO:0050906]	CGI_10027764
	Cation-transporting ATPase (EC 7.2.2.-) (Fragment)	ATPase activity [GO:0016887]; ATP binding [GO:0005524]; metal ion binding [GO:0046872]	Integral component of membrane [GO:0016021]	Cation transport [GO:0006812]	CGI_10026567
	Zinc finger protein rotund	nucleic acid binding [GO:0003676]	-	-	CGI_10028616
	Uncharacterized protein	nucleic acid binding [GO:0003676]	-	-	CGI_10028629
	Cell division protein kinase 8	ATP binding [GO:0005524]; protein serine/threonine kinase activity [GO:0004674]	-	Cell division [GO:0051301]	CGI_10027818
	ATP-binding cassette sub-family F member 3	ATPase activity [GO:0016887]; ATP binding [GO:0005524]	-	-	CGI_10027843
	G2/mitotic-specific cyclin-B3	Protein kinase binding [GO:0019901]	Nucleus [GO:0005634]	Regulation of cyclin-dependent protein serine/threonine kinase activity [GO:0000079]; regulation of G2/M transition of mitotic cell cycle [GO:0010389]	CGI_10027959
	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit, mitochondrial	Isocitrate dehydrogenase (NAD+) activity [GO:0004449]; magnesium ion binding [GO:0000287]; NAD binding [GO:0051287]; peptidase activity [GO:0008233]	Mitochondrion [GO:0005739]	Tricarboxylic acid cycle [GO:0006099]	CGI_10026892
	Eukaryotic translation initiation factor 5B	GTPase activity [GO:0003924]; GTP binding [GO:0005525]; translation initiation factor activity [GO:0003743]	-	-	CGI_10028339
	Kynurenine-oxoglutarate transaminase 3	Catalytic activity [GO:0003824]; pyridoxal phosphate binding [GO:0030170]	Integral component of membrane [GO:0016021]	Biosynthetic process [GO:0009058]	CGI_10028395
	Fatty acid 2-hydroxylase (EC 1.-.-.-)	Fatty acid alpha-hydroxylase activity [GO:0080132]; iron ion binding [GO:0005506]	Endoplasmic reticulum membrane [GO:0005789]; integral component of membrane [GO:0016021]	Fatty acid biosynthetic process [GO:0006633]	CGI_10027207
	Zinc finger and BTB domain-containing protein 24	Nucleic acid binding [GO:0003676]	-	-	CGI_10027997
	HMGB1 (High mobility group protein B3)	DNA binding [GO:0003677]	Nucleus [GO:0005634]	-	CGI_10028136
	Vascular endothelial growth factor receptor 1	ATP binding [GO:0005524]; calcium ion binding [GO:0005509]; transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity [GO:0004714]	Integral component of membrane [GO:0016021]	-	CGI_10028178
	EF-hand domain-containing family member A2	Calcium ion binding [GO:0005509]	-	Mitochondrial calcium ion transmembrane transport [GO:0006851]	CGI_10028181
	Uridine kinase (EC 2.7.1.48)	ATP binding [GO:0005524]; uridine kinase activity [GO:0004849]	-	CTP salvage [GO:0044211]; nucleoside metabolic process [GO:0009116]; UMP salvage [GO:0044206]	CGI_10028208

Tabla XIV. Anotación y ontología de los DMR hipermetilados con función en componente celular en intrones del fenotipo termo-resistente de *C. gigas*

Proceso	Nombre de proteína	Ontología de genes			ID
		Función molecular	Componente celular	Proceso biológico	
Component of membrane	Protoheme IX farnesyltransferase, mitochondrial	Protoheme IX farnesyltransferase activity [GO:0008495]	Integral component of membrane [GO:0016021]; mitochondrial membrane [GO:0031966]	Heme O biosynthetic process [GO:0048034]	CGI_10028764
	Mitochondrial Rho GTPase (EC 3.6.5.-)	Calcium ion binding [GO:0005509]; GTPase activity [GO:0003924]; GTP binding [GO:0005525]	Integral component of mitochondrial outer membrane [GO:0031307]	Mitochondrion organization [GO:0007005]	CGI_10028781
	Transient receptor potential-gamma protein	Calcium channel activity [GO:0005262]	Integral component of membrane [GO:0016021]	-	CGI_10028437
	Solute carrier family 35 member F5	-	Integral component of membrane [GO:0016021]	-	CGI_10028548
	Sodium/calcium exchanger 2	-	Integral component of membrane [GO:0016021]	Transmembrane transport [GO:0055085]	CGI_10027465
	Otopetrin-2	-	Integral component of membrane [GO:0016021]	-	CGI_10027737
	Cation-transporting ATPase (EC 7.2.2.-) (Fragment)	ATPase activity [GO:0016887]; ATP binding [GO:0005524]; metal ion binding [GO:0046872]	Integral component of membrane [GO:0016021]	Cation transport [GO:0006812]	CGI_10026567
	Uncharacterized protein	Calcium activated cation channel activity [GO:0005227]	Integral component of membrane [GO:0016021]	Detection of temperature stimulus [GO:0016048]; protein tetramerization [GO:0051262]; sensory perception of temperature stimulus [GO:0050951]	CGI_10028233
	Selenocysteine lyase	Lyase activity [GO:0016829]	Integral component of membrane [GO:0016021]	-	CGI_10027821
	MMS19 nucleotide excision repair-like protein	Metalloendopeptidase activity [GO:0004222]	Integral component of membrane [GO:0016021]	Protein maturation by iron-sulfur cluster transfer [GO:0097428]	CGI_10028884
	Magnesium transporter NIPA2	Magnesium ion transmembrane transporter activity [GO:0015095]	Integral component of membrane [GO:0016021]	-	CGI_10026908
	FRAS1-related extracellular matrix protein 2	-	Integral component of membrane [GO:0016021]	Cell communication [GO:0007154]	CGI_10028320
	Kynurenine-oxoglutarate transaminase 3	Catalytic activity [GO:0003824]; pyridoxal phosphate binding [GO:0030170]	Integral component of membrane [GO:0016021]	Biosynthetic process [GO:0009058]	CGI_10028395
	Uncharacterized protein	-	Integral component of membrane [GO:0016021]	-	CGI_10027050
	Potassium voltage-gated channel subfamily H member 7	Voltage-gated potassium channel activity [GO:0005249]	Integral component of membrane [GO:0016021]	Regulation of ion transmembrane transport [GO:0034765]	CGI_10027006
	Fatty acid 2-hydroxylase (EC 1.-.-.-)	Fatty acid alpha-hydroxylase activity [GO:0080132]; iron ion binding [GO:0005506]	endoplasmic reticulum membrane [GO:0005789]; Integral component of membrane [GO:0016021]	Fatty acid biosynthetic process [GO:0006633]	CGI_10027207
	Transmembrane protein 2	-	Integral component of membrane [GO:0016021]	-	CGI_10026658
	TLC domain-containing protein	-	Integral component of membrane [GO:0016021]	-	CGI_10027988
	V-type proton ATPase subunit S1	Proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism [GO:0046961]; proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism [GO:0046933]	Integral component of membrane [GO:0016021]; proton-transporting V-type ATPase, V1 domain [GO:0033180]	-	CGI_10028139
	Vascular endothelial growth factor receptor 1	ATP binding [GO:0005524]; calcium ion binding [GO:0005509]; transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity [GO:0004714]	Integral component of membrane [GO:0016021]	-	CGI_10028178
UDP-sugar transporter UST74c	-	Integral component of membrane [GO:0016021]	Carbohydrate transport [GO:0008643]	CGI_10028207	
Deleted in malignant brain tumors 1 protein	Scavenger receptor activity [GO:0005044]	Integral component of membrane [GO:0016021]	-	CGI_10027681	

Tabla XV. Anotación y ontología de los DMR hipermetilados en intrones con varias funciones presentes en el fenotipo termo-resistente de *C. gigas*

Proceso	Nombre de proteína	Ontología de genes			ID
		Función molecular	Componente celular	Proceso biológico	
Mitochondria	3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial	Isomerase activity [GO:0016853]	-	-	CGI_10028776
Transferase activity	Histone-lysine N-methyltransferase PRDM9	Methyltransferase activity [GO:0008168]	-	Methylation [GO:0032259]	CGI_10028491
	Queuine tRNA-ribosyltransferase subunit QTRTD1	Transferase activity, transferring pentosyl groups [GO:0016763]	-	tRNA modification [GO:0006400]	CGI_10027676
Hydrolase activity	Alpha-galactosidase (EC 3.2.1.-)	Hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds [GO:0004553]	-	Carbohydrate metabolic process [GO:0005975]	CGI_10028541
	Arylsulfatase B	Sulfuric ester hydrolase activity [GO:0008484]	-	-	CGI_10027840
DNA repair	Fanconi anemia group I-like protein	-	-	DNA repair [GO:0006281]	CGI_10028830
Syntase activity	Uroporphyrinogen-III synthase	Uroporphyrinogen-III synthase activity [GO:0004852]	-	Uroporphyrinogen III biosynthetic process [GO:0006780]	CGI_10028893
Oxidoreductase activity	NAD-dependent alcohol dehydrogenase	Oxidoreductase activity [GO:0016491]	-	-	CGI_10027939
Cell division	Kinetochore protein NDC80-like protein	-	Cell [GO:0005623]; Ndc80 complex [GO:0031262]	Attachment of mitotic spindle microtubules to kinetochore [GO:0051315]	CGI_10026906
	Anaphase-promoting complex subunit 4	-	Anaphase-promoting complex [GO:0005680]	Anaphase-promoting complex-dependent catabolic process [GO:0031145]; regulation of mitotic metaphase/anaphase transition [GO:0030071]	CGI_10027235
	Uncharacterized protein	-	Centriole [GO:0005814]; synapse [GO:0045202]	Chemical synaptic transmission [GO:0007268]; cilium assembly [GO:0060271]; mitochondrion organization [GO:0007005]	CGI_10028838

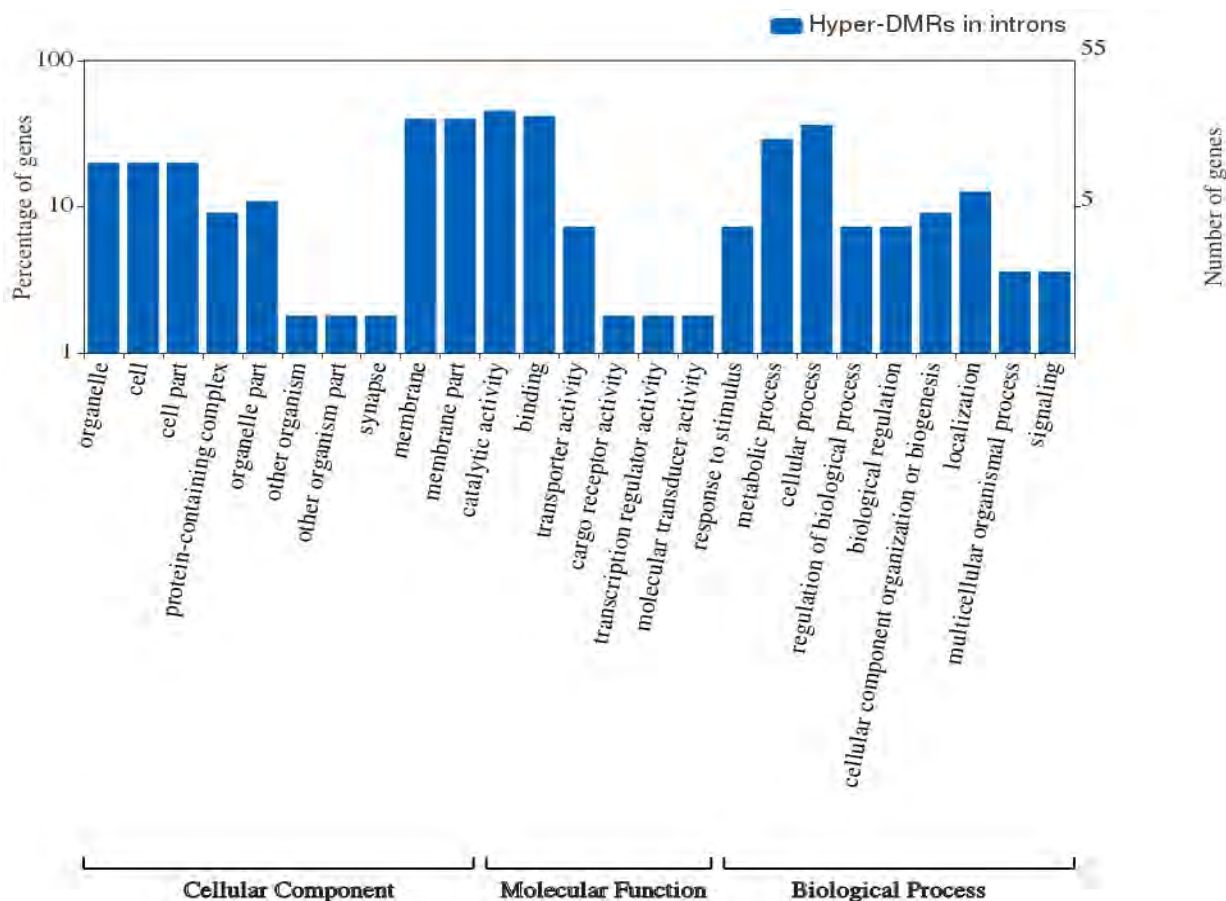


Figura 21. Categorías ontológicas del total de DMR hipermetiladas en regiones intrónicas en el fenotipo termo-resistente de *C. gigas*

Adicionalmente, del total de DMR hipermetiladas, solo 24 no se asignaron a un gen de referencia dentro del genoma, por lo tanto se consideraron como no anotados.

Los intrones que presentaron DMR hipometiladas en el fenotipo termo-resistente fueron asignados a genes involucrados en procesos de unión, actividad hidrolasa, metalopeptidasa y actividad de metilación. Del total de hipometilados, tres DMR no fueron asignadas a un gen (Tabla XVI).

Tabla XVI. Anotación y ontología de los intrones con DMR hipometiladas en el fenotipo termo-resistente de *C. gigas*

Proceso	Nombre de proteína	Ontología de genes			ID
		Función molecular	Componente celular	Proceso biológico	
Binding protein	Pyridoxine-5'-phosphate oxidase	FMN binding [GO:0010181]; pyridoxamine-phosphate oxidase activity [GO:0004733]	-	Pyridoxine biosynthetic process [GO:0008615]	CGI_10028532
	Uridine kinase (EC 2.7.1.48)	ATP binding [GO:0005524]; uridine kinase activity [GO:0004849]	-	CTP salvage [GO:0044211]; nucleoside metabolic process [GO:0009116]; UMP salvage [GO:0044206]	CGI_10028208
Hydrolase	5-oxoprolinase	Hydrolase activity [GO:0016787]	-	-	CGI_10028534
Methylation	Putative methyltransferase C20orf7-like protein, mitochondrial	Methyltransferase activity [GO:0008168]	-	Methylation [GO:0032259]	CGI_10027856
Metallopeptidase	ADAM 17-like protease	Metallopeptidase activity [GO:0008237]	-	-	CGI_10028144
Without GO	Uncharacterized protein	-	-	-	CGI_10027760
	Ankyrin repeat domain-containing protein 46	-	-	-	CGI_10028618
	Uncharacterized protein	-	-	-	CGI_10028170

7.9.5 DMR hipermetiladas en múltiples regiones de un gen en ostiones del fenotipo termo-resistente

De los genes que presentaron más de una DMR hiper o hipometilada, ninguno se relacionó con regiones promotoras. Sin embargo, después de corroborar la localización de las DMR, con el programa IGV-v2.4.14, solo cuatro DMR hipermetiladas en exones estuvieron también presentes en intrones (Tabla XVII).

Tabla XVII. DMR hipermetiladas en exones e intrones en un mismo gen.

Promotores	Exones	Intrones	Nombre de proteína	Ontología de genes			ID
				Función molecular	Componente celular	Proceso biológico	
x	SI	SI	ATP-binding cassette sub-family F member 3	ATPase activity [GO:0016887]; ATP binding [GO:0005524]	-	-	CGI_10027843
x	SI	SI	Magnesium transporter NIPA2	Magnesium ion transmembrane transporter activity [GO:0015095]	integral component of membrane [GO:0016021]	-	CGI_10026908
x	SI	SI	Queuine tRNA-ribosyltransferase subunit QTRTD1	Transferase activity, transferring pentosyl groups [GO:0016763]	-	tRNA modification [GO:0006400]	CGI_10027676
x	SI	SI	General transcription factor 3C polypeptide 1	-	-	-	CGI_10027531

De estos genes con múltiples DMR hipermetiladas en un mismo gen del fenotipo termo-resistente, se analizó su ontología, donde se relacionaron principalmente con procesos metabólicos y celulares. Adicionalmente se encontraron genes relacionados con funciones moleculares de tipo unión y actividad catalítica (Fig. 22).

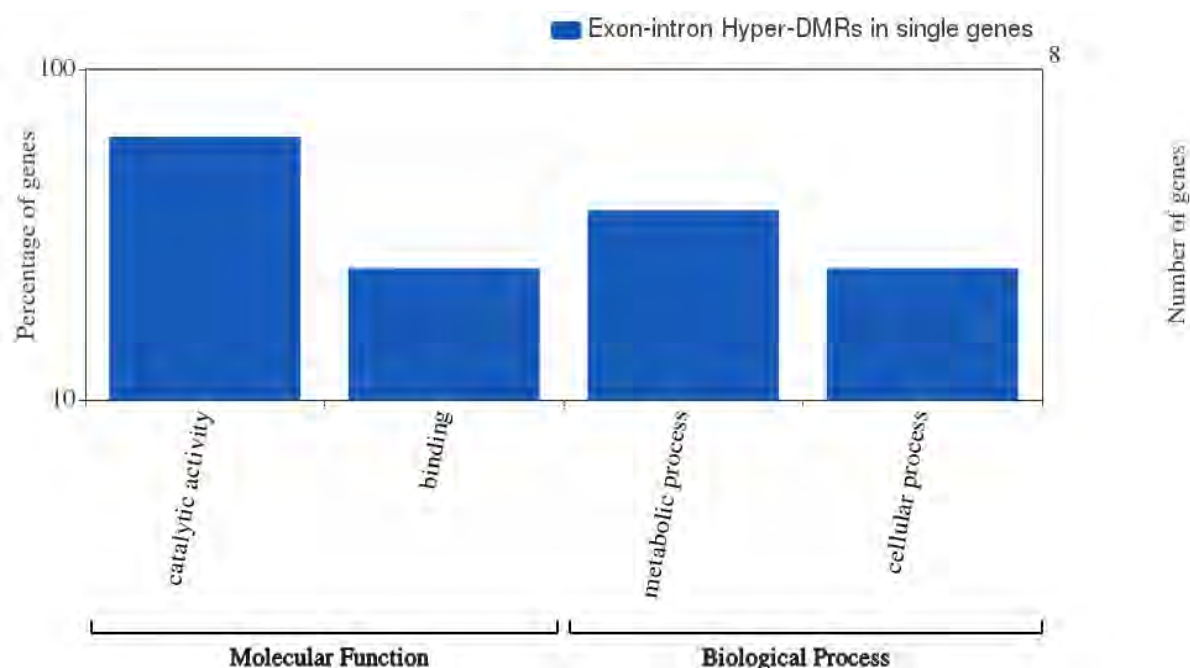


Figura 22. Ontología de genes con múltiples DMR hipermetiladas en un mismo gen en el fenotipo termo-resistente

7.10 Transcritos expresados diferencialmente con DMR entre fenotipos

La determinación de la relación entre metilación y expresión se realizó al comparar las DMR hipermetiladas y localizadas en promotores (2), exones (31) e intrones (128), incluyendo también las DMR hipometiladas en promotores (1), exones (3) e intrones (10). Este listado de hiper e hipo-metilaciones comparadas con los listados de transcritos sobre y sub-regulados del día 30 del reto térmico crónico, mostraron dos transcritos sobre-regulados que presentaron DMR hipermetiladas. Otros dos transcritos sobre-regulados presentaron hiper e hipo-metilaciones, dos transcritos sub-regulados presentaron DMR hipermetiladas y 1 con hipo-metilación (Fig. 23; Table XVIII).

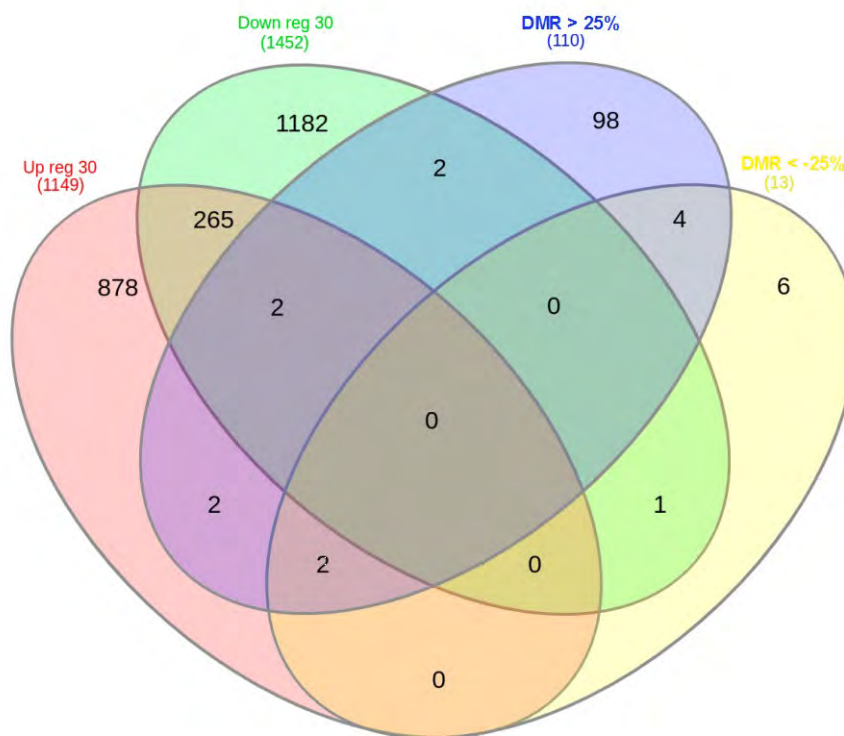


Figura 23. Transcritos sobre y sub-expresados diferencialmente comparados con DMR hiper e hipometilados

Tabla XVIII. Transcritos sobre y sub-regulados que presentaron DMR

Sitio metilado	Gene ID	Transcrito	Valores de expresión			Valores de metilación			Anotación		
			logFC	logCPM	PValue	Pval	qval	Valor de metilación	Nombre de proteína	Ontología de genes (GO)	GO Ids
Exon	CGI_10028548	6389	3.555678	2.027197	0.015955	1.64E-10	7.36E-09	37.3134328	Solute carrier family 35 member F5	integral component of membrane [GO:0016021]	GO:0016021
Exon	CGI_10026838	95004	-3.48389	2.477684	0.00553	2.37E-05	0.000347	30.1402331	MAGUK p55 subfamily member 5	plasma membrane [GO:0005886]; bicellular tight junction assembly [GO:0070830]; establishment of epithelial cell polarity [GO:0090162]	GO:0005886; GO:0070830; GO:0090162
Intron	CGI_10028170	107862	2.587027	2.631593	0.014791	1.15E-13	8.59E-12	52.3033464	Uncharacterized protein	-	-
Intron	CGI_10027416	13208	-3.16407	1.931303	0.032475	0.000107	0.001277	26.6828626	Liprin-beta-1		
Intron	CGI_10027758	18577	4.56051	2.378859	0.00113	0.000715	0.006486	25.036075	LIM domain only protein 7	metal ion binding [GO:0046872]	GO:0046872
Intron	CGI_10028233	27451	4.001109	2.162313	0.011202	4.59E-06	8.19E-05	32.4577114	Uncharacterized protein	integral component of membrane [GO:0016021]; ion channel activity [GO:0005216]; protein tetramerization [GO:0051262]	GO:0005216; GO:0016021; GO:0051262
Intron	CGI_10027465	14931	-3.97171	2.71578	0.023688	0.000656	0.006061	27.9667423	Sodium/calcium exchanger 2	integral component of membrane [GO:0016021]; antiporter activity [GO:0015297]; calcium ion transport [GO:0006816]	GO:0006816; GO:0015297; GO:0016021
Intron	CGI_10027130	30290	-3.24386	2.97766	0.048354	1.32E-14	1.11E-12	29.3435201	Reticulocyte-binding protein 2-like protein a	-	-
Intron	CGI_10028144	107707	-2.51838	3.396423	0.001857	8.41E-51	1.8E-47	-31.608484	ADAM 17-like protease	metallopeptidase activity [GO:0008237]	GO:0008237

En relación a las hipermetilaciones en los diferentes sitios del gen, se consideró el ejemplo de un exón hipermetilado del gen *MAGUK p55 subfamily member 5*. Esta metilación se posicionó en el exón #1, en donde se observó que todas las familias presentaron esta hipermetilación con mayor proporción en las familias termo-resistentes (R52 y R59; Fig. 24).

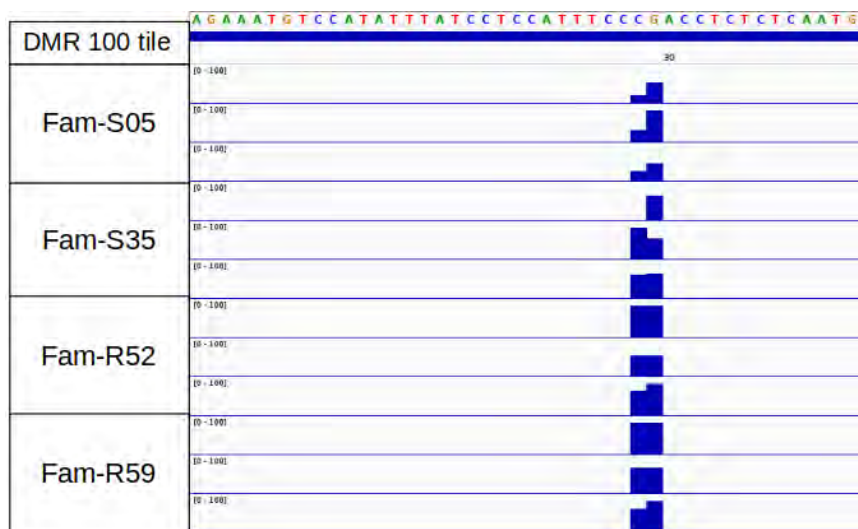


Figura 24. Posición de hipermetilación en el exón #1 del gen *MAGUK p55 subfamily member 5* diferenciada entre familias termo-resistentes (R52 y R59) y termo-susceptibles (S05 y S35)

En la hipermetilación observada en el primer exón de este gen, se localizó en el gráfico de expresión, donde la presencia de esta región metilada se encuentra en las familias termo-resistentes y termo-susceptibles, especialmente en las isoformas 95003, 95004, 95005 y 95006 (Fig. 25). Así mismo, La expresión fue mayormente presente en las isoformas 95005 y 95004 para el fenotipo termo-resistente. Sin embargo, no se observó una relación puntual entre valores expresión relacionadas con las funciones de diferenciación de isoformas entre fenotipos originada por la metilación.

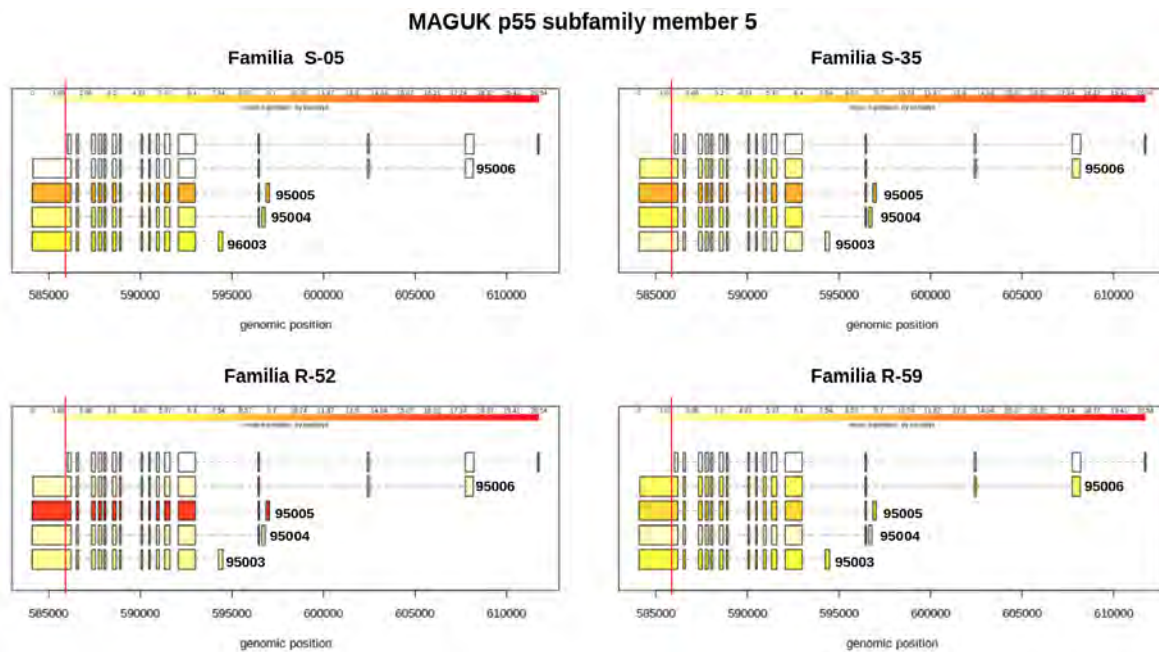


Figura 25. Niveles de expresión de las isoformas gen MAGUK p55 subfamily member 5 entre familias termo-resistentes (R52 y R59) y termo-susceptibles (S05 y S35) y posicionamiento de hipermetilación en el exón #1 (línea roja)

8. DISCUSIÓN

La selección de familias termo-resistentes y termo-susceptible se basó en reportes previos de exposición a temperatura letal en donde el 100% de la mortalidad se presenta entre los 39°C y 40°C (57), observando 100% de mortalidad en ostiones expuestos a 44°C durante una hora. A diferencia del tiempo en que se presentó el 100% de mortalidad de las dos familias resistentes que fue de 31 y 32 horas, y para las susceptibles de 22 a 28 horas, obteniendo que el tiempo en donde se presentó el 50% de mortalidad de las dos familias resistentes fue de 15.7 y 16.2 horas, mientras que para las susceptibles fueron a las 9.3 y 12.5 horas.

8.1 Análisis de parentesco con microsatélites

El origen del pie de cría del programa de mejoramiento genético, contiene la incorporación de genomas de las poblaciones de *C. gigas* provenientes de Australia, EUA y Chile. Estas poblaciones geográficamente aisladas, adoptaron polimorfismos genéticos particulares que se pudieron observar en estudios previos (58–61) mediante el uso de marcadores moleculares como los microsatélites, nombrados también como repeticiones cortas en tándem (STR por sus siglas en inglés). Estos marcadores moleculares han sido utilizados por más de dos décadas gracias a su alto polimorfismo informativo presente en el genoma (62). Su aplicación en este trabajo fue de gran importancia para la determinación de un punto de control, y así corroborar el linaje de las familias experimentales. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, el análisis parental con el método de exclusión tiene la desventaja de la posible presencia de alelos nulos, como se sugiere al utilizar el microsatélite ucdCg06 y CG49. Sin embargo, la información ausente por los alelos nulos se complementó con el análisis de los microsatélites L48 y L10. Por lo tanto, con el uso de estos cuatro loci de microsatélites se logró obtener el genotipo de cada muestra, que permitió establecer el parentesco de las muestras de cada familia. Esto aseguró la veracidad del análisis transcriptómico, donde se comparan las muestras representativas de los fenotipos termo-resistentes y termo-susceptibles.

8.2 Análisis transcriptómico

Para estos análisis se seleccionaron las branquias de los ostiones debido a que es un tejido en donde se presenta respuesta ante el estrés térmico, ya que son un sensor relacionado con

cambios ambientales durante el intercambio de gases (63), representando un tejido conveniente para estudiar la expresión génica en respuesta al estrés térmico (2,5,23,63,64). Por otra parte, se ha corroborado que en branquias de *C. gigas* se presenta expresión génica diferencial entre grupos de ostiones con alta y baja supervivencia al estrés térmico (5).

De las muestras de ARN de cada familia genotipificada, se obtuvo una adecuada secuenciación con calidades de lectura de Q mayor a 30, las cuales representan un valor con una probabilidad de error de 1/1000 (65). El ensamblaje de estas secuencias utilizando un genoma de referencia, resolvió aproximadamente un 90% de los errores iniciales de secuenciación, determinando con mayor eficiencia las variantes de isoformas generadas por corte y empalme alternativo (66). Es por ello que la selección del método de ensamblaje guiado por genoma de referencia confiere ventajas sobre los métodos de ensamblaje *de novo*, como se reportó por Gavery y Roberts (17). Asimismo, el uso del programa HISAT2, complementado con StringTie, permitió eficientizar el ensamblaje del transcriptoma, así como lo ha descrito Kim *et al.* (46) con secuencias de humano.

Del total de transcritos mapeados y ensamblados con el genoma de referencia, se obtuvieron los valores de expresión diferencial entre las librerías correspondientes a las muestras del día cero y el día 30 del reto térmico crónico, donde los perfiles de expresión por librería (observados en la figura 12) comprueban el agrupamiento de las réplicas biológicas sugiriendo que tienen un comportamiento muy similar.

8.3 Genes expresados diferencialmente durante el reto térmico entre fenotipos

Desde el inicio (día cero) del reto térmico crónico, se presentaron diferencias transcripcionales entre fenotipos en los genes con ontologías de procesos biológicos (PB) como regulación de procesos celulares y de respuesta a estímulos, y localización celular; los componentes celulares (CC) enriquecidos fueron los organelos intracelulares, y las funciones moleculares (FM) se relacionan con actividad de regulación de transcripción, y actividad de factores de transcripción unidos a ADN. Esta última función se ha considerado como una de las importantes para llevar a cabo respuestas a corto plazo, observando un incremento en la actividad de unión a ácidos

nucleicos (9). Estos procesos también se modifican en la exposición de *C. gigas* a 20°C, sobresaliendo los términos enriquecidos como la actividad de regulación de transcripción, y unión a ácidos nucleicos (8,10). Con base a lo anterior, se corrobora que existen diferencias entre los fenotipos previos a la exposición del reto crónico; sin embargo, estas diferencias se presentaron posterior al ajuste de la temperatura de aclimatación antes del reto térmico en donde se aumentó la temperatura de 25 a 30°C, aumentando dos grados por día. Por lo tanto las diferencias de expresión entre fenotipos RR y SS en el día cero son probablemente causadas por la aclimatación así como por las diferencias fenotípicas.

Al final del reto térmico (día 30), las diferencias entre fenotipos aumentaron respecto al número de transcritos expresados diferencialmente que se establecieron como sobre-regulados, pero no presentaron diferencias a nivel ontológico respecto al día 0. Sin embargo, de los transcritos sobre-regulados destacaron aquellos relacionados con la cadena respiratoria y metabolismo energético, donde inicialmente de 44 términos enriquecidos (al día 0), incrementó a 72 (al día 30). Asimismo, los términos enriquecidos relacionados con metabolismo de ácidos nucleicos incrementaron de 22 a 24. Este comportamiento de respuesta a estrés térmico se presenta desde temperaturas de 15 a 20°C, donde el aumento de transcritos relacionados con términos enriquecidos en la cadena respiratoria, metabolismo energético y metabolismo de ácidos nucleicos, es positivamente proporcional al aumento de temperatura (23). El cambio de comportamiento de respuesta fisiológica relacionado con el aumento de temperatura, ha sido ligado con la plasticidad fenotípica del ostión, diferenciando familias o poblaciones que logran sobrevivir a estos cambios al aumentar su tasa respiratoria a temperaturas elevadas (35°C) (67).

8.3.1 Transcritos asociados al fenotipo como marcadores de diferenciación

Como se reportó en la figura 20, se observaron 170 transcritos sobre-regulados y 170 sub-regulados que se conservaron expresados diferencialmente entre fenotipos desde el inicio del experimento.

Estos transcritos conservados forman parte de algunos procesos de respuesta a estrés térmico; tal es el caso de aquellos que participan en los procesos de deterioro celular en la matriz

extracelular (ECM). Esto implica diferente respuesta al estrés térmico entre fenotipos, ligados a la función de la ECM en la adhesión, acoplamiento del citoesqueleto y migración celular (68). La ECM se compone principalmente de macromoléculas como proteoglicanos y proteínas fibrosas como el colágeno, la elastina, la fibronectina y la laminina (69). Parte de las proteínas mencionadas que se obtuvieron en esta comparación son el *Collagen alpha-2(VIII) chain* que estuvo diferencialmente expresada tanto en termo-resistentes (CGI_10015044) como en termo-susceptibles (CGI_10002101 y CGI_10002102). Sin embargo, la diferencia entre estos transcritos es la posición en la cual se mapearon en el genoma. Por otra parte, las diferencias de marcadores entre fenotipos respecto a componentes de la ECM, se encontraron en los transcritos *Fibrinogen alpha-2 chain (Fragment)* (CGI_10028579) para termo-resistentes y *Collagen alpha-5(VI) chain* (CGI_10003288) en termo-susceptibles, así como se ha reportado previamente en otros trabajos (5).

Adicionalmente para el fenotipo termo-resistente, se presentaron transcritos sobre-expresados relacionados con la muerte celular programada, como *apoptosis inhibitor 1 y 2* (CGI_10026771) y *apoptosis regulator R1* (CGI_10005605), las cuales llevan a cabo el control del número de células y volumen del tejido, protegiendo al organismo de células que amenazan la homeostasis (70). Adicionalmente, se presentaron transcritos codificantes de la *Caspase-7* (CGI_10023426), que es un efector intracelular para *granzyme B* en la regulación de la apoptosis (71,72). Bajo este contexto, los transcritos marcadores para termo-resistentes están diferencialmente asociados con procesos de regulación de apoptosis, a diferencia de los termo-susceptibles que no sobre-expresaron estos transcritos.

Una de las familias de proteínas más estudiadas en relación a retos térmicos en el ostión del Pacífico son las HSP70, que se encontraron diferenciadas entre fenotipos desde el inicio del experimento. Para el caso de los termo-susceptibles se sobre-expresó la *Heat shock 70 kDa protein 12A* (CGI_10013525), y la *Heat shock 70 kDa protein 12B* (CGI_10011415). Mientras que esta última también se presentó sobre-expresada en termo-resistentes, (CGI_10002387), fue mapeada en una región diferente en el genoma que la expresada en termo-susceptibles. Con estos resultados, se corrobora lo reportado por trabajos previos, donde las HSP70 aumentan a

partir de los 33°C con un pico máximo a los 37°C (2). Aunque se ha reportado que los niveles de expresión de la familia HSP70 entre grupos de *C. gigas* con alta supervivencia y baja supervivencia al aumento de temperatura no muestran diferencias significativas dentro de un grupo poblacional (5), en el presente trabajo el transcrito de la proteína HSC70, que codifica para la proteína heat-shock 70 expresada constitutivamente (*Hsc70-interacting protein*) solo se encontró sub-expresada en el fenotipo termo-susceptible. La función de este transcrito está en su C-terminal, quien se une y promueve la degradación del *estrogen-receptor-alpha* por medio de la ruta metabólica de *ubiquitin-proteasome* (73). Por lo tanto, las familias termo-susceptibles presentaron más marcadores relacionados con las HSPs, lo cual indica que en la presencia de las Hsp70 y las Hsc70 en termo-susceptibles, se activaron procesos de agregación de estas proteínas que interactúan con fosfolípidos en la membrana celular para la formación de canales iónicos (74). Asimismo, durante este proceso, se ha sugerido su posible función durante procesos de apoptosis, especialmente cuando la interacción de las Hsp70s ocurre en el espacio extracelular (75).

Otra de las diferencias destacadas entre marcadores de fenotipos fue el gen sobre-expresado en ostiones termo-resistentes, *5-methyltetrahydrofolate--homocysteine methyltransferase*, que codifica la enzima *metionina sintasa* quien tiene un papel en el metabolismo de folatos, catalizando la remetilación de la homocisteína (Hcy) a metionina, convirtiéndose en una reacción esencial para regular la concentración de metionina y la Hcy intracelular (76). Con lo anterior, se sugiere que los procesos relacionados con el metabolismo de folatos, que contribuye durante el proceso de metilación del ADN, se están llevando a cabo en familias termo-resistentes desde el inicio del reto térmico crónico y se mantiene así hasta el final del reto.

8.4 Metilación global entre fenotipos térmicos de *C. gigas*

Se sabe que entre los invertebrados, la metilación global del ADN es muy variable y es menor (0.3 a 29%) que la que se observa en los vertebrados (70 a 80%). Además, la metilación de CpG en *C. gigas* es más alta que la de CHG o CHH (33); hecho que fue corroborado en este estudio, donde la metilación promedio de CpG fue de 14.4% y la de CHH de 1%. Considerando que las

diferencias en la metilación ocurren de una manera tejido específico (77), nuestros resultados para la metilación global promedio (14,4%) fueron cercanos al 15% reportado para *C. gigas* por Gavery y Roberts (64), también evaluado en tejido de branquia. El rango de CpG de metilación global para todos los individuos fue del 13 al 16%; este resultado representa la primera evidencia de la existencia de variabilidad en la metilación global entre individuos de *C. gigas*. Alternativamente, la intra-variabilidad en las familias fue mucho menor, con un máximo del 2%. Las diferencias de metilación global se han reportado incluso en tejido de manto entre ostiones de diferente origen, en donde un ostión con cierto grado endogámico de Puget, EE. UU. presentó 15.96% de metilación global y un ostión silvestre de Weihai, China presentó el 16.25% (33), lo cual coincide con lo reportado previamente en *C. gigas* (64,78).

Por otra parte, se sabe que el medio ambiente influye en la metilación del ADN y que existe una asociación con los fenotipos observados. Por ejemplo, para la planta *Quercus lobate*, el gradiente climático está relacionado con variaciones en las metilaciones del ADN (79). Además, los fenotipos de la abeja *Apis mellifera* se ven afectados por la metilación (80). Sin embargo, el porcentaje de metilación global no mostró diferencias significativas para los ostiones con diferentes fenotipos (resistente y susceptible) en el presente trabajo, aunque hubo diferencias de metilación entre fenotipos para las regiones metiladas diferencialmente (DMR) en el cuerpo de los genes.

8.5 Análisis de DMR entre fenotipos térmicos

La distribución de CpG metiladas en el genoma de los ostiones fue mayor en intrones, seguida de exones, y por último por promotores. La metilación del ADN en intrones se ha asociado con estabilidad de la cromatina (78) y la metilación en exones está relacionada positivamente con la expresión génica y el corte y empalme alternativo (81). Adicionalmente, se ha observado que en *C. gigas*, las regiones de los genes metilados son mayormente expresados (78,82), observando que los promotores metilados del genoma de *C. gigas*, presentan una asociación positiva con altos niveles de expresión de dicho gen, contrario a la correlación positiva que se presenta en vertebrados.

Con los resultados obtenidos sobre la localización de las regiones metiladas, estas se han encontrado en genes con funciones relacionadas con procesos como la señalización celular, respuesta a estímulos, respuesta a estrés y procesos metabólicos específicos, que también han sido reportados previamente para *C. gigas* (64,78).

Los procesos biológicos más abundantes de las DMR entre fenotipos fueron los procesos celulares y metabólicos ($P < 0.01$), seguidos de la biogénesis ($P = 0.008$), respuesta a estímulos, y señalización ($P < 0.01$), coincidiendo con la inferencia bioinformática previa para el genoma de *C. gigas* (83). Una de las ontologías más abundante fue la adhesión celular (GO:0007155), que proviene de la ontología ascendente de procesos celulares (GO:0009987) que previamente se encontró abundantemente entre ostiones *C. gigas* bajo dos temperaturas (84).

Mientras que las diferencias en la metilación entre fenotipos de resistencia térmica pueden ser resultado de que los genes se desmetilan o se hiper-metilan al ser expuestos a temperaturas oscilantes durante 30 días, estas diferencias también pudieran deberse a la historia de vida de las familias causando modificaciones en respuesta diferencial al medio ambiente en donde crecieron. Aunque este no es el caso para las familias analizadas en este trabajo, existen reportes de *C. gigas* crecido en dos zonas, intermareal y submareal, en donde se encontró que las diferencias de metilación fueron mayores entre los grupos antes de ser expuestas a estrés térmico agudo. Esto permitió concluir que la metilación del ADN está fuertemente influenciada por la historia de vida en ambientes específicos (84).

Las regiones hiper o hipometiladas en promotores, exones e intrones, han sido sugeridas como marcadores epigenéticos de metilación para ser utilizados en la selección de reproductores termo-resistentes, estrategia que se ha aplicado en plantas (22). Sin embargo, antes es necesario continuar evaluando estas DMRs entre generaciones para establecer su herencia.

8.5.1 DMR en promotores entre fenotipos térmicos de *C. gigas*

Únicamente dos promotores diferencialmente metilados presentaron anotación. El promotor de la subunidad dinactina 4, encontrado hipermetilado en las familias termo-resistentes, es

parte de un complejo de dinactina que funciona en los procesos de división celular, ubicado en los microtúbulos astrales como complejo dineína-dinactina, regulando la orientación y la posición del huso (85–89). En embriones de *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* y células humanas, la dineína-dinactina contribuye al posicionamiento del huso en los microtúbulos astrales (90–95). Además, una función del complejo de dinactina específica está presente en las neuronas motoras de *Drosophila* durante el crecimiento de la sinapsis (95). La dinactina está clasificada con el término ontológico ascendente GO:0015629, que pertenece a la actina del citoesqueleto, y es un gen esencial. Este tipo de genes están comúnmente metilados porque son genes indispensables para realizar las funciones celulares, como se reporta para *C. gigas* en donde los genes con funciones esenciales son comúnmente regulados por metilación (83).

El segundo promotor con hipermetilaciones se localizó en el gen de la proteína 19, que contiene el dominio MYDN del dedo de zinc y podría regular el gen uniendo el motivo del dedo de zinc a regiones con alto contenido de prolina, sirviendo como un módulo de interacción proteína-proteína (96,97). Estas proteínas MYDN de dedo de zinc se han relacionado en el proceso como metilación de una variedad de histonas cuando se combinan con proteínas SET (Suppressor of variegación, Enhancer of Zeste, Trithorax) (98). Entre sus funciones se sabe que participa en la regulación celular, incluida la remodelación de la cromatina, la transcripción, la traducción de señales y el control del ciclo celular.

Las pocas diferencias de metilación entre los promotores de los termo-fenotipos de *C. gigas*, se relacionan al bajo porcentaje (< 5%) de metilación que presenta el genoma de *C. gigas* en esta región (64), sugiriendo que la metilación en promotores es estable entre las cuatro familias evaluadas después de la exposición a temperatura oscilante, debido a que solo tres promotores presentaron hiper e hipo-metilación.

8.5.2 DMR exónicas e intrónicas en fenotipos térmicos de *C. gigas*

La metilación en promotores de los fenotipos evaluados sugiere baja divergencia entre genotipos; sin embargo, en exones e intrones se incrementaron las hiper e hipo metilaciones atribuidas a la variabilidad génica de las familias del programa de mejoramiento genético

conformadas por ostiones de tres orígenes, permitiendo que la plasticidad fenotípica favorezca la resistencia a altas temperaturas. El incremento de las metilaciones diferenciales en exones e intrones está de acuerdo con el hecho de que en el genoma de *C. gigas* estas han sido reportadas como regiones con alto contenido de metilación (64).

Las familias termo-resistentes de *C. gigas* presentaron DMR hipermetiladas en 23 exones de 18 genes, y sólo 3 hipo-metilaciones. La presencia de más hipermetilaciones en familias termo-resistentes pudiera estar asociada a la regulación de estos genes para contrarrestar las altas temperaturas. Incrementos de hipermetilaciones ha sido observado en *C. gigas* de la zona intermareal, la cual se caracteriza por presentar mayores temperaturas que los ostiones de la zona submareal (84). Otros trabajos en *C. gigas* han reportado que los exones incluidos en el ARNm están comúnmente hipermetilados en el gen, mientras que los exones sin metilaciones son omitidos (81). Por otro lado, es importante mencionar que una alta metilación en los exones puede resultar en el arresto de los sitios de inicio de la transcripción fuera del promotor, generando una transcripción truncada (18).

Se sabe que las metilaciones en el cuerpo génico proporcionan una regulación positiva para el corte y empalme alternativo; esto es, un exón cuando está altamente metilado será incluido en el transcrito (99). Esto se observó en histonas, donde la metilación en el exón 5 provoca que se mantenga durante el proceso de corte y empalme alternativo (100). Esto se debe a de la ARN polimerasa II con los sitios metilados en el ADN, ya que reduce su eficiencia, permitiendo la transcripción del exón (16,101,102). Estos procesos de regulación por metilación pueden ser desencadenados por algunos factores ambientales, como la temperatura, que influye en la metilación de las histonas (34). Esto coincide con el exón hipermetilado de la proteína *heterocromatin protein 1-binding protein 3* (CGI_10028772), relacionada a la familia de histonas H15. Este exón hipermetilado fue el único asociado con los procesos de metilación del ADN, ya que el resto de los exones hipermetilados están relacionados con los procesos biológicos de organización del componente celular, que son procesos celulares esenciales para el funcionamiento celular (83).

La mayoría de los exones hipermetilados en las familias termo-resistentes fueron incluidos en la ontología de proteínas de unión, como son: la *proteína citoadherente 2 de alto peso molecular* (CGI_10027082) con asignación ontológica en componente celular ($P < 0.001$), y cuya función está relacionada al ensamblaje de proteínas accesorias durante la división celular (103); la *purina citolítica 5'-nucleotidasa* (CGI_10027233), que participa en el metabolismo de ácidos nucleicos (104) y es clasificada en procesos metabólicos ($P < 0.001$); la *proteína 2 de unión NEDD4* (CGI_10028574) perteneciente a las proteínas ubiquitina ligasas, conformada por dominios de unión a lípidos (105); el *gen de unión al ATP de la sub-familia F miembro 3* (CGI_10027843) presente durante la regulación traduccional (Powell et al., 2013); y el *regulador transcripcional ATRX* (CGI_10027273) asociado con su interacción con el ADN condensado durante la transcripción, replicación y reparación del ADN (106).

La función de las metilaciones en los genes anteriormente mencionadas es desconocida en *C. gigas*, sin embargo, se encuentran en genes asociados con funciones generalmente hipermetiladas, a diferencia de las hipermetilaciones que se encuentran en genes asociados al sistema inmune, los cuales no fueron encontradas diferencias entre fenotipos. Interesantemente, los genes con exones hipermetilados observados para las familias termo-resistentes en comparación con las familias susceptibles sugieren la inclusión de algunos exones en el ARNm y la expresión de diferentes isoformas en familias resistentes.

Por otro lado, las metilaciones diferenciales en el cuerpo de los genes en *C. gigas* se presentaron mayormente en intrones, con una mayor metilación en intrones, como se encontró en estudios previos para esta misma especie (33,64,82). Se ha sugerido que las metilaciones en intrones desempeñan un papel coordinador central de la estabilidad epigenética del ADN (107). Adicionalmente las hipermetilaciones en intrones pueden estar involucradas con el aumento de la expresión de genes cuando ocurre hipermetilación en el primer intrón, como se ha observado para la lubina *Dicentrarchus labras* (108), e incluso también se ha observado que participan en la elongación adecuada de la transcripción (109). Asimismo, los intrones hipermetilados pueden producir cambios en la expresión génica, ya que las secuencias potenciadoras presentes en las regiones intrónicas están relacionadas con la activación génica (110,111).

La hipermetilación de intrones (122) fue mucho mayor que los intrones hipometilados (10), tal como se observó en promotores y exones. Los intrones hipermetilados se encontraron en genes que participan en funciones celulares esenciales con ontologías de procesos metabólicos y biológicos, y con funciones moleculares mayormente representadas por unión a proteínas y actividad catalítica. Estas hipermetilaciones en familias termo-resistentes permite inferir que la transcripción de estos genes fue funcional, similarmente a lo que se ha observado en humanos, donde la hipometilación de los intrones se correlaciona con la retención de estos en el transcrito, lo que eventualmente produce una pérdida de función al conducir a una proteína truncada o traducida fuera del marco de lectura (112). Con base a lo anterior, las hipermetilaciones en el cuerpo del gen en las familias termo-resistentes, sugieren mejor control de la transcripción de los genes asociados a funciones esenciales.

De los intrones hipermetilados, se encontraron por ejemplo los de los genes *zinc finger protein rotund* y *zinc finger BTB domain containing protein 24* involucrada en el reconocimiento del ADN metilado, y el gen *histone-lysine N-methyltransferase PRDM9* involucrado en la metilación. Estos son genes funcionales en humanos cuando están hipermetilados, pero cuando están hipometilados eventualmente pierden su función debido a la retención del intrón en el ARNm (112). El único gen con un intrón hipometilado que está involucrado en procesos de metilación fue el *putative methyltransferase C20orf-7 like protein*. Mientras que los resultados indican que ciertos genes involucrados en la metilación del ADN están regulados entre fenotipos por metilación, los genes *ADN metiltransferasas (DNMTs)* involucrados en la metilación *de novo* y de mantenimiento no fueron diferenciales entre fenotipos.

8.5.3 Múltiples hiper o hipo-DMR en *C. gigas* entre fenotipos térmicos

Como se mencionó anteriormente, las regiones exónicas diferencialmente metiladas pueden estar involucradas en la regulación de la retención de exones durante el corte y empalme, mientras que las regiones diferencialmente metiladas en los intrones contribuyen a la estabilidad del ADN así como al arresto prematuro de la transcripción.

Cuatro genes presentaros múltiples DMRs en exones e intrones asociados a las funciones moleculares de actividad catalítica y unión. Estos genes con múltiples hiper-DMRs fueron: la *proteína miembro 3 de la subfamilia F del casete de unión a ATP* (CGI_10027843), involucrada en la vía de las citocinas inflamatorias regulando la traducción (113), el gen *NIPA2 transportador de magnesio* (CGI_10026908) que participa en procesos celulares involucrados en la importación de iones a la célula desencadenados por choque térmico, siendo una proteína de membrana en el transporte de iones Mg^{+2} (114); perteneciente a un grupo de 4 variantes, en donde NIPA2 es más selectiva que NIPA1, NIPA3 y NIPA4 (115) para aumentar la concentración de Mg^{+2} . Adicionalmente, se encontró el gen de la *subunidad de proteína queuine tRNA-ribosyltransferasa QTRTD1* (CGI_10027676), cuya proteína tiene varias funciones moleculares en humanos, incluida la unión de iones metálicos, la actividad de heterodimerización de proteínas, la actividad de homodimerización de proteínas y la actividad de queuine tRNA-ribosyltransferasa (116,117). Además de los procesos celulares, también se observaron genes implicados en la regulación de la transcripción con DMR en diferentes regiones, como el *polipéptido 1 del factor de transcripción general 3C* (CGI_10027531). Los estudios sobre estos tipos de factores de transcripción muestran interacción con promotores internos de genes de ARNt y otras unidades de transcripción de la polimerasa III (118). Estos genes con múltiples DMRs en familias termo-resistentes, fueron asociados a procesos metabólicos generales, los cuales son esenciales para la célula, como se ha observado en eventos posteriores al incremento de temperatura (9,23), en donde los ostiones regulan estos procesos en función al incremento de la temperatura. Los genes con múltiples DMR hipermetiladas tanto en las regiones intrónicas como exónicas para las familias termo-resistentes, sugieren ser genes sujetos a una mayor regulación epigenética.

8.5.4 Genes expresados diferencialmente entre fenotipos con DMR en intrones y exones

Las hiper e hipo metilaciones entre fenotipos se presentaron en 3 promotores, 26 exones y 132 intrones; sin embargo, cuando estos se compararon con los genes expresados diferencialmente (DE) al día 30, no se encontró ninguna relación, sugiriendo que la temperatura a la cual se realizó la exposición oscilatoria no causó modificaciones en la metilación y estas diferencias son características previas al fenotipo. Concluyendo que las hiper e hipo metilaciones no están

regulando la expresión transcripcional; sin embargo, es necesario evaluar estas hipo e hipermetilaciones en más familias e individuos para corroborarlo, debido a que se observó alta variabilidad en los patrones de metilación en los individuos de cada familia, asociado a la alta variabilidad genética.

Debido a que no se encontró relación entre hipo e hipermetilación y expresión diferencial, se realizó la comparación entre regiones diferencialmente metiladas (DMR) y transcritos expresados diferencialmente. Al realizar estas comparaciones de expresión a nivel gen, no se encontró ninguna relación, sin embargo, a nivel transcrito se obtuvieron relaciones para dos exones y siete intrones, sugiriendo que la metilación influye en ciertas isoformas. Para el caso de exones, el gen que codifica para la proteína *Solute carrier family 35 member F5*, presentó una sobre expresión (FC = 3.55) en termo-resistentes y una región metilada diferencialmente (DMR) en un exón, con un 37% más metilado en este fenotipo. Esto sugiere que, en termo-resistentes, las regulaciones epigenéticas y aquellas relacionadas con la sobre-expresión, se relacionan en la regulación de este gen por la necesidad de su función en nucleótidos transportadores de azúcar hacia el interior del aparato de Golgi o retículo endoplasmático para las modificaciones postraduccionales (119). El segundo exón con DMR se relacionó con una isoforma de las cinco que presenta el transcrito sub-expresado que codifica para la proteína *MAGUK p55 subfamily member 5* (FC = -3.48) que presentó una metilación diferencial de 30%. Este gen participa en la comunicación de célula a célula mediante el complejo de membrana que forman las proteínas de este tipo (120). Las metilaciones en estos dos exones se asociaron con un transcrito sobre expresado y uno sub-expresado, por lo cual no hay un patrón definido en los fenotipos evaluados como previamente se ha descrito al encontrar en *C. gigas* una relación positiva. Las metilaciones en estos dos transcritos sugieren que estas metilaciones tienen efectos a nivel isoforma y no a nivel gen. En el caso de intrones, el gen que codifica para la proteína *Leprln-beta-1*, fue sub-expresada (FC = -3.16) en termo-resistentes con un valor de metilación de intrón del 26%. Con base a estos resultados, se asume que en el fenotipo termo-susceptible, esta proteína, quien es parte de la de las *transmembrane tyrosine phosphatase-interacting*, está llevando a cabo procesos relacionados con fosfoproteínas durante el proceso de metástasis, así como se describió en humanos (121). Otro gen sobre-expresado (FC = 4.56) y con DMR (25.03%)

en un intrón fue el que codifica para la proteína *LIM domain only protein 7*, descrito con posibles actividades de unión a la organización del citoesqueleto al interactuar con nectinas, y que incluso participa en la adhesión de célula a célula cuando interactúa con cadherinas (Ott et al., 2008). Por otra parte, se identificó el gen *Sodium/calcium exchanger 2*, relacionado con la modulación iónica y metabólica para $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ (122), que estuvo sub-regulado (FC = -3.9) en termo-resistentes y presentó una DMR (27%) localizada en un intrón. Esto indica que en el fenotipo temo-susceptible se están llevando a cabo tanto regulaciones epigenéticas que pudiesen estar relacionadas con los cambios de expresión de este gen, y que como consecuencia, se potencializa la actividad de intercambio iónico durante el estrés térmico. De igual forma, se identificó otro gen que codifica para la proteína *Reticulocyte-binding protein 2-like protein*, el cual fue sub-regulado (FC = -3.24) y con una DMR (29.3%) en un intrón. La expresión de esta proteína sobre-expresada en termo-susceptibles, tiene como función la moderación del tráfico de vesículas dentro de la célula, y que se ha descrito en humanos para la maduración de glóbulos rojos (123). Sin embargo, considerando los efectos del reto térmico crónico, se sugiere que la actividad de migración de vesículas está siendo mayor en el fenotipo susceptible en comparación con los resistentes. Por último, se observó el gen que codifica para la proteína *ADAM 17-like protease*, que codifica para una enzima que al unirse con sustratos de tipo citocinas, receptores de citocinas, y proteínas de adhesión, se involucra en diversos procesos, como respuesta inmune, crecimiento, control de inflamación y regeneración, todos relacionados con el aumento de la expresión en termo-susceptibles.

Con base a lo anterior, se puede inferir que la temperatura está desencadenando diferentes procesos de respuesta transcripcional entre fenotipos. No obstante, los patrones de metilación asociados a los genes expresados diferencialmente no son muy claros. Esto se puede deber a la alta variabilidad genética presente en el programa de mejoramiento genético,) que ha permitido establecer la respuesta transcripcional a estrés térmico como un carácter no relacionado directamente con regulaciones epigenéticas. Sin embargo, las DMR reportadas entre fenotipos sí representan marcas conservadas que se sugieren como buenos candidatos de marcadores epigenéticos que proporcionan información para la diferenciación entre fenotipos.

La ausencia de una relación entre hipo e hipo metilaciones y la expresión diferencial (DE), pudiera deberse a 1) las pocas diferencias de metilación que se encontraron entre fenotipos, o 2) las diferencias en la respuesta transcripcional entre fenotipos expuestos a estrés térmico no están reguladas por metilación. Las diferencias encontradas entre fenotipos en la metilación pudieran influir en la respuesta ante otros factores ambientales. Independientemente, estas diferencias pueden servir como marcas de metilación para identificar fenotipos una vez corroborado lo observado en este trabajo.

9. CONCLUSIONES

Los análisis transcriptómicos mostraron el agrupamiento de los perfiles de expresión diferencial para las familias termo-resistentes 52 y 59, a diferencia de las termo-susceptibles 05 y 35, comprobando que existe una variación respecto al número de genes presentes que pueden estar involucrados en favorecer la termo-tolerancia. Estos genes se encontraron sobre-regulados en familias de fenotipo resistente desde el inicio del experimento (día cero), donde procesos como actividad de factores de transcripción, actividad de correpresores de transcripción, actividad de factores de transcripción de unión a ácidos nucleicos. Asimismo, las funciones de respuesta a estrés térmico, para las familias de fenotipo resistente al día 30, aumentaron en función a la transcripción de los genes relacionados con complejos de matriz extracelular y actividad oxidorreductasa intramolecular, entre otros. Por lo tanto, el fenotipo resistente presenta un perfil transcriptómico diferente a los termo-susceptibles, que le confiere ventajas durante la respuesta al estrés térmico.

Los genes hipermetilados fueron más abundantes en las familias con fenotipo termo-resistente en comparación con familias termo-susceptibles. Las hipermetilaciones en termo-resistentes se localizaron en promotores (2), exones (23) e intrones (122) para genes relacionados con procesos que incluyen la unión a iones, componentes de membrana, metabolismo energético y regulación de la transcripción de ADN y ARN. La activación de estos procesos sugiere una estrategia de las familias resistentes para mejorar su plasticidad fenotípica cuando aumentan las temperaturas. Asimismo, las hipermetilaciones en exones de familias resistentes están asociadas con la retención de exones, generando diferentes isoformas de las producidas por familias susceptibles a partir de un solo gen. Las hiper e hipo-metilaciones en familias resistentes se sugieren como metilaciones marcadoras para predecir fenotipos para apoyar la reproducción en una futura selección de reproductores para familias de ostras resistentes a las altas temperaturas en los sitios de cultivo.

Mientras que las diferencias entre fenotipos a nivel transcriptómico y epigenético fueron claras, no estuvieron correlacionadas. La regulación de la expresión de los genes de respuesta a estrés

térmico por marcas de metilación en promotores, exones o intrones no fue muy clara, posiblemente asociado a la alta variabilidad genética que presenta el programa de mejoramiento genético. No obstante, se sugiere ampliar el rango de análisis a más de una generación, para la determinación de marcas epigenéticas heredadas y de carácter de mantenimiento, o bien, si son metilaciones *de novo* activadas por el aumento de temperatura.

10. LITERATURA CITADA

1. Chávez-Villalba J. Cultivo de ostión *Crassostrea gigas*: Análisis de 40 años de actividades en México. *Hidrobiologica*. 2014;24(3):175–90.
2. Hamdoun AM, Cheney DP, Cherr GN. 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*. 2003;205(2):160–9.
3. López-Maury L, Marguerat S, Bähler J. Tuning gene expression to changing environments: From rapid responses to evolutionary adaptation. *Nat Rev Genet*. 2008;9(8):583–93.
4. Huvet A, Herpin A, Dégremont L, Labreuche Y, Samain JF, Cunningham C. The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene*. 2004;343(1):211–20.
5. Lang RP, Bayne CJ, Camara MD, Cunningham C, Jenny MJ, Langdon CJ. Transcriptome profiling of selectively bred pacific oyster *Crassostrea gigas* families that differ in tolerance of heat shock. *Mar Biotechnol*. 2009;11(5):650–68.
6. Schmitt P, Santini A, Vergnes A, Degremont L, de Lorgeril J. Sequence Polymorphism and Expression Variability of *Crassostrea gigas* Immune Related Genes Discriminate Two Oyster Lines Contrasted in Term of Resistance to Summer Mortalities. *PLoS One*. 2013;8(9):1–15.
7. Lim HJ, Lim JS, Lee JS, Choi BS, Kim DI, Kim HW, et al. Transcriptome profiling of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* by Illumina RNA-seq. *Genes and Genomics*. 2016;38(4):359–65.
8. Lim HJ, Kim BM, Hwang IJ, Lee JS, Choi IY, Kim YJ, et al. Thermal stress induces a distinct transcriptome profile in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comp Biochem Physiol - Part D Genomics Proteomics*. 2016;19:62–70.
9. Zhu Q, Zhang L, Li L, Que H, Zhang G. Expression Characterization of Stress Genes Under High and Low Temperature Stresses in the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *Mar Biotechnol*. 2016;18(2):176–88.
10. Zhao X, Yu H, Kong L, Liu S, Li Q. Comparative transcriptome analysis of two oysters, *Crassostrea gigas* and *Crassostrea hongkongensis* provides insights into adaptation to hypo-osmotic conditions. *PLoS One*. 2014;9(11):1–11.
11. Samain JF, Dégremont L, Soletchnik P, Haure J, Bédier E, Ropert M, et al. Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture*. 2007;268(1-4 SPEC. ISS.):227–43.
12. Camara MD, Yen S, Kaspar HF, Kesarcodi-Watson A, King N, Jeffs AG, et al. Assessment of heat shock and laboratory virus challenges to selectively breed for ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) resistance in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture [Internet]*. 2017;469:50–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.11.031>
13. Delisle L, Pauletto M, Vidal-Dupiol J, Petton B, Bargelloni L, Montagnani C, et al. High temperature induces transcriptomic changes in *Crassostrea gigas* that hinder progress of ostreid herpesvirus (OsHV-1) and promote survival. *J Exp Biol*. 2020;223(20).
14. Berthelin C, Kellner K, Mathieu M. Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France).

- Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol. 2000;125(3):359–69.
15. Kuzawa CW, Thayer ZM. Timescales of human adaptation: The role of epigenetic processes. *Epigenomics*. 2011;3(2):221–34.
 16. Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev*. 2011;25(10):1010–22.
 17. Roberts SB, Gavery MR. Is there a relationship between DNA methylation and phenotypic plasticity in invertebrates? *Front Physiol*. 2012;2 JAN(January):1–5.
 18. Gavery MR. Epigenomic and Transcriptomic Regulation of Environmental Responses in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. ProQuest Diss Theses [Internet]. 2014;133. Available from:
http://sfx.scholarsportal.info/guelph/docview/1622999212?accountid=11233%5Cnhttp://sfx.scholarsportal.info/guelph?url_ver=Z39.88-2004&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:dissertation&genre=dissertations+%26+theses&sid=ProQ:ProQuest+Dissertations+%26+Theses+A
 19. Riviere G, Wu GC, Fellous A, Goux D, Sourdain P, Favrel P. DNA Methylation Is Crucial for the Early Development in the Oyster *C. gigas*. *Mar Biotechnol*. 2013;15(6):739–53.
 20. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*. 2003;33(3S):245–54.
 21. Wu H, Zhang Y. Reversing DNA methylation: Mechanisms, genomics, and biological functions. *Cell* [Internet]. 2014;156(1–2):45–68. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.019>
 22. Peng H, Zhang J. Plant genomic DNA methylation in response to stresses: Potential applications and challenges in plant breeding. *Prog Nat Sci* [Internet]. 2009;19(9):1037–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnsc.2008.10.014>
 23. Meistertzheim AL, Tanguy A, Moraga D, Thébault MT. Identification of differentially expressed genes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to prolonged thermal stress. *FEBS J*. 2007;274(24):6392–402.
 24. FAO. Total World Fisheries. state world Fish Aquac. 2010;10.
 25. Li Y, Qin JG, Li X, Benkendorff K. Spawning-dependent stress responses in pacific oysters *Crassostrea gigas*: A simulated bacterial challenge in oysters. *Aquaculture* [Internet]. 2009;293(3–4):164–71. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.04.044>
 26. Soletchnik P, Lambert C, Costil K. Summer mortality of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in relation to environmental rearing conditions. *J Shellfish Res*. 2005;24(1):197–207.
 27. Soletchnik P, Ropert M, Mazurié J, Gildas Fleury P, Le Coz F. Relationships between oyster mortality patterns and environmental data from monitoring databases along the coasts of France. *Aquaculture*. 2007;271(1–4):384–400.
 28. Tomanek L, Somero GN. Interspecific- and acclimation-induced variation in levels of heat-shock proteins 70 (hsp70) and 90 (hsp90) and heat-shock transcription factor-1 (HSF1) in congeneric marine snails (genus *Tegula*): Implications for regulation of hsp gene expression. *J Exp Biol*. 2002;205(5):677–85.
 29. Piano A, Franzellitti S, Tinti F, Fabbri E. Sequencing and expression pattern of inducible heat shock gene products in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Gene*. 2005;361(1–2):119–26.

30. Deaton AM, Webb S, Kerr ARW, Illingworth RS, Guy J, Andrews R, et al. Cell type-specific DNA methylation at intragenic CpG islands in the immune system. *Genome Res.* 2011;21(7):1074–86.
31. Crider KS, Yang TP, Berry RJ, Bailey LB. Folate and DNA methylation: A review of molecular mechanisms and the evidence for Folate's role. *Adv Nutr.* 2012;3(1):21–38.
32. Campos C, Valente LMP, Conceição LEC, Engrola S, Fernandes JMO. Temperature affects methylation of the myogenin putative promoter, its expression and muscle cellularity in Senegalese sole larvae. *Epigenetics.* 2013;8(4).
33. Wang X, Li Q, Lian J, Li L, Jin L, Cai H, et al. Genome-wide and single-base resolution DNA methylomes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* provide insight into the evolution of invertebrate CpG methylation. *BMC Genomics.* 2014;15(1).
34. Fellous A, Favrel P, Riviere G. Temperature influences histone methylation and mRNA expression of the Jmj-C histone-demethylase orthologues during the early development of the oyster *Crassostrea gigas*. *Mar Genomics [Internet].* 2015;19:23–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.margen.2014.09.002>
35. Gan JK, Zhang DX, He DL, Zhang XQ, Chen ZY, Luo QB. Promoter methylation negatively correlated with mRNA expression but not tissue differential expression after heat stress. *Genet Mol Res.* 2013;12(1):809–19.
36. Schaible TD, Harris RA, Dowd SE, Smith CW, Kellermayer R. Maternal methyl-donor supplementation induces prolonged murine offspring colitis susceptibility in association with mucosal epigenetic and microbiomic changes. *Hum Mol Genet.* 2011;20(9):1687–96.
37. Khot V, Kale A, Joshi A, Chavan-Gautam P, Joshi S. Expression of genes encoding enzymes involved in the one carbon cycle in rat placenta is determined by maternal micronutrients (folic acid, vitamin B12) and omega-3 fatty acids. *Biomed Res Int.* 2014;2014.
38. Sicard -González MT, Tripp -Valdéz MA, Ocampo L, Maeda -Martínez AN, Lluch -Cota SE. Coastal Sea Surface Temperature Records Along the Baja California Peninsula. *CICIMAR Oceanides.* 2012;27(2):65.
39. Fregoso E. genotipificación de *perkinsus marinus* e inmunogenómica de *crassostrea corteziensis* infectado con *p. marinus* aislado del noroeste de México. Vol. 148. 148–162 p.
40. McGoldrick DJ, Hedgecock D, English LJ, Baoprasertkul P, Ward RD. The transmission of microsatellite alleles in Australian and North American stocks of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): Selection and null alleles. *J Shellfish Res.* 2000;19(2):779–88.
41. Li G, Hubert S, Bucklin K, Ribes V, Hedgecock D. Characterization of 79 microsatellite DNA markers in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mol Ecol Notes.* 2003;3(2):228–32.
42. Appleyard SA, Ward RD. Genetic diversity and effective population size in mass selection lines of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture.* 2006;254(1–4):148–59.
43. Magoulas A et al. Application of molecular markers to aquaculture and broodstock management with special emphasis on microsatellite DNA. *Cah Options Méditerranées [Internet].* 1998;168:153–68. Available from: <http://ressources.ciheam.org/om/pdf/c34/98606201.pdf>
44. Jones AG, Ardren WR. Methods of parentage analysis in natural populations. *Mol Ecol.* 2003;12(10):2511–23.
45. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, et al. The RIN: An

- RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol.* 2006;7:1–14.
46. Kim D, Langmead B, Salzberg SL. HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods* [Internet]. 2015;12(4):357–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.3317>
 47. Pertea M, Kim D, Pertea GM, Leek JT, Salzberg SL. Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown. *Nat Protoc* [Internet]. 2016;11(9):1650–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2016-095>
 48. Frazee A, Pertea G, Jaffe A, Langmead B, Salzberg S, Leek J. Flexible analysis of transcriptome assemblies with Ballgown. *bioRxiv.* 2014;003665.
 49. Pertea G, Pertea M. GFF Utilities: GffRead and GffCompare. *F1000Research.* 2020;9:1–19.
 50. Supek F, Bošnjak M, Škunca N, Šmuc T. Revigo summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One.* 2011;6(7).
 51. Ye J, Zhang Y, Cui H, Liu J, Wu Y, Cheng Y, et al. WEGO 2.0: A web tool for analyzing and plotting GO annotations, 2018 update. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(W1):W71–5.
 52. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014;30(15):2114–20.
 53. Krueger F, Andrews SR. Bismark: A flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. *Bioinformatics.* 2011;27(11):1571–2.
 54. Akalin A, Kormaksson M, Li S, Garrett-Bakelman FE, Figueroa ME, Melnick A, et al. MethylKit: a comprehensive R package for the analysis of genome-wide DNA methylation profiles. *Genome Biol.* 2012;13(10).
 55. Quinlan AR, Hall IM. BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics.* 2010;26(6):841–2.
 56. Lindquist S. THE HEAT-SHOCK RESPONSE. 1986;
 57. Rajagopal S, Van Der Velde G, Jansen J, Van Der Gaag M, Atsma G, Janssen-Mommen JPM, et al. Thermal tolerance of the invasive oyster *Crassostrea gigas*: Feasibility of heat treatment as an antifouling option. *Water Res.* 2005;39(18):4335–42.
 58. Taris N, Baron S, Sharbel TF, Sauvage C, Boudry P. A combined microsatellite multiplexing and boiling DNA extraction method for high-throughput parentage analyses in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquac Res.* 2005;36(5):516–8.
 59. Launey S, Hedgecock D. High genetic load in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genetics.* 2001;159(1):255–65.
 60. Li Q, Yu H, Yu R. Genetic variability assessed by microsatellites in cultured populations of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in China. *Aquaculture.* 2006;259(1–4):95–102.
 61. Yu H, Li Q. Exploiting EST databases for the development and characterization of EST-SSRs in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *J Hered.* 2008;99(2):208–14.
 62. Baumung R, Simianer H, Hoffmann I. Genetic diversity studies in farm animals - A survey. *J Anim Breed Genet.* 2004;121(6):361–73.
 63. Farcy É, Voiseux C, Lebel JM, Fiévet B. Transcriptional expression levels of cell stress marker genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to acute thermal stress. *Cell Stress Chaperones.* 2009;14(4):371–80.
 64. Gavery MR, Roberts SB. Predominant intragenic methylation is associated with gene expression characteristics in a bivalve mollusc. *PeerJ.* 2013;2013(1):1–15.

65. Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* 1998;8(3):186–94.
66. Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M, Grabherr M, Blood PD, Bowden J, et al. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat Protoc.* 2013;8(8):1494–512.
67. Ding F, Li A, Cong R, Wang X, Wang W, Que H, et al. The Phenotypic and the Genetic Response to the Extreme High Temperature Provides New Insight Into Thermal Tolerance for the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Front Mar Sci.* 2020;7(June):1–15.
68. Schmidt S, Friedl P. Interstitial cell migration: Integrin-dependent and alternative adhesion mechanisms. *Cell Tissue Res.* 2010;339(1):83–92.
69. bruce alberts, alexander johnson, julian lewis, martin raff, keit roberts peter wlter. *The molecular biology of the cell.* 5th ed. Paper Knowledge . Toward a Media History of Documents. Garland Science; 2014.
70. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis : Abstract : Nature. *Nature* [Internet]. 2000;407(6805):770–6. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/35037710%5Cnpapers2://publication/doi/10.1038/35037710>
71. Gelfman S, Cohen N, Yearim A, Ast G. DNA-methylation effect on cotranscriptional splicing is dependent on GC architecture of the exon-intron structure. *Genome Res.* 2013;23(5):789–99.
72. Reed JC. Warner-Lambert/Parke Davis award lecture: Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* [Internet]. 2000;157(5):1415–30. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64779-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64779-7)
73. Zhang QG, Han D, Wang RM, Dong Y, Yang F, Vadlamudi RK, et al. C terminus of Hsc70-interacting protein (CHIP)-mediated degradation of hippocampal estrogen receptor- α and the critical period hypothesis of estrogen neuroprotection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(35).
74. Arispe N, Doh M, De Maio A. Lipid interaction differentiates the constitutive and stress-induced heat shock proteins Hsc70 and Hsp70. *Cell Stress Chaperones.* 2002;7(4):330–8.
75. Arispe N, Doh M, Simakova O, Kurganov B, Maio A De. Hsc70 and Hsp70 interact with phosphatidylserine on the surface of PC12 cells resulting in a decrease of viability. *FASEB J.* 2004;18(14):1636–45.
76. Galbiatti ALS, Ruiz MT, Chicote-Biselli PM, Raposo LS, Maniglia J V., Pavarino-Bertelli EC, et al. 5-Methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase gene polymorphism (mtr) and risk of head and neck cancer. *Brazilian J Med Biol Res.* 2010;43(5):445–50.
77. Maunakea AK, Nagarajan RP, Bilenky M, Ballinger TJ, Dsouza C, Fouse SD, et al. Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature* [Internet]. 2010;466(7303):253–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature09165>
78. Olson CE, Roberts S, Young G. DNA methylation variation in gametes and larvae of the Pacific oyster,. 2014;
79. Gugger PF, Fitz-Gibbon S, Pellegrini M, Sork VL. Species-wide patterns of DNA methylation variation in *Quercus lobata* and their association with climate gradients. *Mol Ecol.* 2016;25(8):1665–80.
80. Strachecka A, Olszewski K, Bajda M, Demetraki-Paleolog J. Natural larval diet differently

- influences the pattern of developmental changes in DNA 5-methylcytosine levels in *Apis mellifera* queens as compared with workers and drones. *Biochem*. 2015;80(8):1019–25.
81. Song K, Li L, Zhang G. The association between DNA methylation and exon expression in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *PLoS One*. 2017;12(9):1–12.
 82. Riviere G, He Y, Tecchio S, Crowell E, Gras M, Sourdaine P, et al. Dynamics of DNA methylomes underlie oyster development. *PLoS Genet*. 2017;13(6):1–16.
 83. Gavery MR, Roberts SB. DNA methylation patterns provide insight into epigenetic regulation in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *BMC Genomics*. 2010;11(1).
 84. Wang X, Wang M, Wang W, Liu Z, Xu J, Jia Z, et al. Transcriptional changes of Pacific oyster *Crassostrea gigas* reveal essential role of calcium signal pathway in response to CO₂-driven acidification. *Sci Total Environ* [Internet]. 2020;741:140177. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140177>
 85. O’Connell CB, Wang YL. Mammalian spindle orientation and position respond to changes in cell shape in a dynein-dependent fashion. *Mol Biol Cell*. 2000;11(5):1765–74.
 86. Schuyler SC, Pellman D. Microtubule “plus-end-tracking proteins”: The end is just the beginning. *Cell*. 2001;105(4):421–4.
 87. Rogers SL, Rogers GC, Sharp DJ, Vale RD. *Drosophila* EB1 is important for proper assembly, dynamics, and positioning of the mitotic spindle. *J Cell Biol*. 2002;158(5):873–84.
 88. Mimori-Kiyosue Y, Tsukita S. “Search-and-Capture” of Microtubules through Plus-End-Binding Proteins (+TIPs). *J Biochem*. 2003;134(3):321–6.
 89. Samora CP, Mogessie B, Conway L, Ross JL, Straube A, McAinsh AD. MAP4 and CLASP1 operate as a safety mechanism to maintain a stable spindle position in mitosis. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2011;13(9):1040–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2297>
 90. Du Q, Macara IG. Mammalian Pins is a conformational switch that links NuMA to heterotrimeric G proteins. *Cell*. 2004;119(4):503–16.
 91. Siller KH, Cabernard C, Doe CQ. The NuMA-related Mud protein binds Pins and regulates spindle orientation in *Drosophila* neuroblasts. *Nat Cell Biol*. 2006;8(6):594–600.
 92. Jones DO, Cowell IG, Singh PB. Mammalian chromodomain proteins: Their role in genome organisation and expression. *BioEssays*. 2000;22(2):124–37.
 93. Nguyen-Ngoc T, Afshar K, Gönczy P. Coupling of cortical dynein and G α proteins mediates spindle positioning in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Cell Biol*. 2007;9(11):1294–302.
 94. Woodard GE, Huang N-N, Cho H, Miki T, Tall GG, Kehrl JH. Ric-8A and G α Recruit LGN, NuMA, and Dynein to the Cell Cortex To Help Orient the Mitotic Spindle. *Mol Cell Biol*. 2010;30(14):3519–30.
 95. Chang L, Kreko T, Davison H, Cusmano T, Wu Y, Rothenfluh A, et al. Normal dynactin complex function during synapse growth in *Drosophila* requires membrane binding by Arfaptin. *Mol Biol Cell*. 2013;24(11):1749–64.
 96. Liu Y, Chen W, Gaudet J, Cheney MD, Roudaia L, Cierpicki T, et al. Structural Basis for Recognition of SMRT/N-CoR by the MYND Domain and Its Contribution to AML1/ETO’s Activity. *Cancer Cell*. 2007;11(6):483–97.
 97. Kateb F, Perrin H, Tripsianes K, Zou P, Spadaccini R, Bottomley M, et al. Structural and Functional Analysis of the DEAF-1 and BS69 MYND Domains. *PLoS One*. 2013;8(1).
 98. Spellmon N, Holcomb J, Trescott L, Sirinupong N, Yang Z. Structure and function of SET

- and MYND domain-containing proteins. *Int J Mol Sci.* 2015;16(1):1406–8.
99. Maunakea AK, Chepelev I, Cui K, Zhao K. Intragenic DNA methylation modulates alternative splicing by recruiting MeCP2 to promote exon recognition. *Cell Res [Internet].* 2013;23(11):1256–69. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2013.110>
 100. Shukla S, Kavak E, Gregory M, Imashimizu M, Shutinoski B, Kashlev M, et al. CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. *Nature [Internet].* 2011;479(7371):74–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature10442>
 101. Lorincz MC, Dickerson DR, Schmitt M, Groudine M. Intragenic DNA methylation alters chromatin structure and elongation efficiency in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol.* 2004;11(11):1068–75.
 102. Kornblihtt AR. Chromatin, transcript elongation and alternative splicing. *Nat Struct Mol Biol.* 2006;13(1):5–7.
 103. Seto S, Layh-Schmitt G, Kenri T, Miyata M. Visualization of the attachment organelle and cytoadherence proteins of *Mycoplasma pneumoniae* by immunofluorescence microscopy. *J Bacteriol.* 2001;183(5):1621–30.
 104. Zimmermann H. 5'-Nucleotidase: Molecular structure and functional aspects. *Biochem J.* 1992;285(2):345–65.
 105. Jolliffe CN, Harvey KF, Haines BP, Parasivam G, Kumar S. Identification of multiple proteins expressed in murine embryos as binding partners for the WW domains of the ubiquitin-protein ligase Nedd4. *Biochem J.* 2000;351(3):557–65.
 106. Tang P, Park DJ, Graves JAM, Harley VR. ATRX and sex differentiation. *Trends Endocrinol Metab.* 2004;15(7):339–44.
 107. Rigal M, Kevei Z, Pélissier T, Mathieu O. DNA methylation in an intron of the IBM1 histone demethylase gene stabilizes chromatin modification patterns. *EMBO J.* 2012;31(13):2981–93.
 108. Anastasiadi D, Vandeputte M, Sánchez-Baizán N, Allal F, Piferrer F. Dynamic epimarks in sex-related genes predict gonad phenotype in the European sea bass, a fish with mixed genetic and environmental sex determination. *Epigenetics [Internet].* 2018;13(9):988–1011. Available from: <https://doi.org/10.1080/15592294.2018.1529504>
 109. Foret S, Kucharski R, Pellegrini M, Feng S, Jacobsen SE, Robinson GE, et al. DNA methylation dynamics, metabolic fluxes, gene splicing, and alternative phenotypes in honey bees. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(13):4968–73.
 110. Blattler A, Yao L, Witt H, Guo Y, Nicolet CM, Berman BP, et al. Global loss of DNA methylation uncovers intronic enhancers in genes showing expression changes. *Genome Biol.* 2014;15(9):469.
 111. Zhang L, Li L, Zhu Y, Zhang G, Guo X. Transcriptome Analysis Reveals a Rich Gene Set Related to Innate Immunity in the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*). *Mar Biotechnol.* 2014;16(1):17–33.
 112. Kim D, Shivakumar M, Han S, Sinclair MS, Lee YJ, Zheng Y, et al. Population-dependent intron retention and DNA methylation in breast cancer. *Mol Cancer Res.* 2018;16(3):461–9.
 113. Powell TR, Tansey KE, Breen G, Farmer AE, Craig IW, Uher R, et al. ATP-binding cassette sub-family F member 1 (ABCF1) is identified as a putative therapeutic target of escitalopram in the inflammatory cytokine pathway. *J Psychopharmacol.* 2013;27(7):609–

- 15.
114. Chai JH, Locke DP, Greally JM, Knoll JHM, Ohta T, Dunai J, et al. Identification of Four Highly Conserved Genes between Breakpoint Hotspots BP1 and BP2 of the Prader-Willi/Angelman Syndromes Deletion Region That Have Undergone Evolutionary Transposition Mediated by Flanking Duplicons. *Am J Hum Genet.* 2003;73(4):898–925.
115. Goytain A, Hines RM, Quamme GA. Functional characterization of NIPA2, a selective Mg²⁺ transporter. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 2008;295(4):944–53.
116. Rakovich T, Boland C, Bernstein I, Chikwana VM, Iwata-Reuyl D, Kelly VP. Queuosine deficiency in eukaryotes compromises tyrosine production through increased tetrahydrobiopterin oxidation. *J Biol Chem.* 2011;286(22):19354–63.
117. Chen YC, Kelly VP, Stachura S V., Garcia GA. Characterization of the human tRNA-guanine transglycosylase: Confirmation of the heterodimeric subunit structure. *Rna.* 2010;16(5):958–68.
118. Geiduschek EP, Tocchini-Valentini GP. Transcription by RNA polymerase III. *Annu Rev Biochem.* 1988;57:873–914.
119. Ishida N, Kawakita M. Molecular physiology and pathology of the nucleotide sugar transporter family (SLC35). *Pflugers Arch Eur J Physiol.* 2004;447(5):768–75.
120. Rademacher N, Schmerl B, Lardong JA, Wahl MC, Shoichet SA. MPP2 is a postsynaptic MAGUK scaffold protein that links SynCAM1 cell adhesion molecules to core components of the postsynaptic density. *Sci Rep.* 2016;6(October):1–10.
121. Kriajevska M, Fischer-Larsen M, Moertz E, Vorm O, Tulchinsky E, Grigorian M, et al. Liprin β 1, a member of the family of LAR transmembrane tyrosine phosphatase-interacting proteins, is a new target for the metastasis-associated protein S100A4 (Mts1). *J Biol Chem* [Internet]. 2002;277(7):5229–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110976200>
122. Reuter BYH, Seitz N. the Dependence of Calcium Efflux. 1968;451–70.
123. Prenni JE, Vidal M, Olver CS. Preliminary characterization of the murine membrane reticulocyte proteome. *Blood Cells, Mol Dis* [Internet]. 2012;49(2):74–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2012.05.002>