



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

**EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN DE JUVENILES DEL  
OSTIÓN JAPONÉS *Crassostrea gigas* (Thunberg,  
1793) A DINOFLAGELADOS TÓXICOS  
PRODUCTORES DE TOXINAS DSP Y PSP**

**TESIS**

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

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

P r e s e n t a

**Abel López Cuevas**

La Paz, Baja California Sur, Marzo de 2013

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 13:30 horas del día 28 del Mes de Febrero del 2013, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

" Efecto de la exposición de juveniles de ostion japonés *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) a dinoflagelados tóxicos productores de toxinas DSP y PSP. "

Presentada por el alumno:

Abel López Cuevas

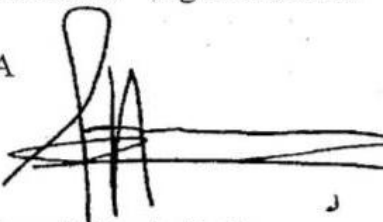
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN: Biotecnología.

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

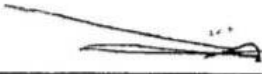
A COMISION REVISORA

  
Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra


DIRECTOR DE TESIS

  
Dr. Alfonso N. Maeda Martínez

CO-TUTOR

  
Dr. Jose Arturo Sanchez Paz

CO-TUTOR

  
DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

## CONFORMACIÓN DE COMITÉS

### **Directora de tesis**

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

### **Comité Tutorial**

Dra. Norma Y. Hernández Saavedra CIBNOR, Campus La Paz.  
Dr. Arturo Sánchez Paz CIBNOR, Campus Hermosillo.  
Dr. Alfonso N. Maeda-Martínez CIBNOR, Campus La Paz.

### **Jurado de Examen**

Dra. Norma Y. Hernández Saavedra CIBNOR, Campus La Paz.  
Dr. Arturo Sánchez Paz CIBNOR, Campus Hermosillo.  
Dr. Alfonso N. Maeda-Martínez CIBNOR, Campus La Paz.

### **Suplente (s)**

Dr. Ricardo Vázquez Juárez CIBNOR, Campus La Paz.  
Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes CIBNOR, Campus La Paz.

## RESUMEN

*Crassostrea gigas* es una especie de gran importancia por el interés científico y por ser una de las especies marinas más cultivada en el mundo. Sin embargo, el cultivo de estos organismos no está exento de problemas ya que las mortalidades en los estadios tempranos de desarrollo, son recurrentes. Romero-Geraldo (2010) y García-Lagunas, (2011), expusieron a juveniles de 3 mm de *C. gigas* a los dinoflagelados *Prorocentrum lima* y *Gymnodinium catenatum* productores de toxinas DSP y PSP respectivamente, obteniendo un perfil de expresión genética en distintos grupos de genes relacionados con diferentes rutas metabólicas de *C. gigas*. Estas especies están reportadas como formadores de Florecimientos Algales Nocivos (FAN) las cuales han coincidido con episodios de elevada mortandad en cultivos de *C. gigas*. Con base a lo anterior, en el presente trabajo se realizó un estudio sobre el efecto ocasionado por la exposición de juveniles de *C. gigas* a una combinación de los dinoflagelados *G. catenatum* y *P. lima* con el propósito de conocer la tasa de expresión de genes relacionados con proteínas de estrés de *C. gigas* (CuZnSOD, GS, GST, HSP<sub>70</sub>) y regulación de ácidos nucleicos (P55). En los bioensayos de exposición en condiciones controladas de laboratorio se probaron tres tratamientos con diferentes combinaciones de *P. lima* + *G. catenatum*, empleando *Isochrysis galbana* como alimento para el grupo control y dos protocolos de exposición: durante 24 h (aguda) y durante 10 días, (subcrónica). Se evaluó el comportamiento en la filtración mediante conteo directo en microscopio y se observó la respuesta de *C. gigas* ante la presencia de los dinoflagelados mediante microscopio estereoscópico. Se extrajo ARN total para sintetizar ADNc utilizado como templado en las amplificaciones de PCR para el análisis de expresión. Los resultados muestran que *C. gigas* filtró totalmente a *G. catenatum* a las 12 horas de exposición en los tres tratamientos, mientras que la filtración del dinoflagelado *P. lima* fue disminuyendo y no fue consumido en su totalidad por el ostión, este comportamiento se observó durante todo el bioensayo además se apreció la formación de pseudoheces sólo para esta especie, reflejándose principalmente en los tratamientos con mayor densidad celular de *P. lima*. Los juveniles de *C. gigas* no exhibieron aparentemente respuestas fisiológicas severas ni mortandad. En el análisis de los amplicones por PCR punto final, la expresión génica se reflejó principalmente en la exposición aguda con puntos críticos de mayor o menor modulación a las 6 y 12 h, alcanzando a las 72 h el comportamiento de la expresión génica observada en el grupo control, lo cual reflejó la capacidad de adaptación del sistema antioxidante de *C. gigas* ante el estrés. Se observó que para GS, GST y P55 las diferencias significativas se reflejaron principalmente en T2 y T3 los cuales presentaron las condiciones experimentales de mayor concentración de *P. lima* (1500 y 3000 cel mL<sup>-1</sup>) presentando semejanzas entre sí en el efecto de la expresión génica de estos genes, los resultados señalan un comportamiento similar al efecto de *P. lima* en los estudios previos de exposición individualizada a esta especie, sugiriendo con esto, que este dinoflagelado representa un mayor riesgo tóxico para *C. gigas*. En el contraste del efecto de la exposición combinada de dinoflagelados tóxicos *G. catenatum* y *P. lima* con los estudios previos de exposición individualizada del grupo de genética molecular se obtuvo para SOD una respuesta sinérgica, mientras que para el resto de genes analizados el comportamiento global observado fue antagónico. Un análisis de expresión cuantitativa en PCR de tiempo real se realizó para confirmar el comportamiento observado en el análisis semicuantitativo de expresión génica.

Palabras clave: *Crassostrea gigas*, *Prorocentrum lima*, *Gymnodinium catenatum*, PSP, DSP, FAN, exposición combinada, RT-PCR, qPCR.

## ABSTRACT

*Crassostrea gigas* is a bivalve mollusk of great importance for its scientific interest and for being one of the most cultured marine species in the world. However, its culture is not problem-free since mortalities in early development stages are recurrent. Romero-Geraldo (2010) and García-Lagunas, (2011) exposed 3-mm *C. gigas* juveniles to the dinoflagellates *Prorocentrum lima* and *Gymnodinium catenatum*, DSP and PSP toxin producers respectively, obtaining a gene expression profile in different gene groups related to diverse metabolic pathways of *C. gigas*. These species are reported as producers of harmful algal blooms (HABs), which have coincided with high mortality episodes in *C. gigas* cultures. Based on the above, in this work we studied the effect caused by exposing juvenile *C. gigas* to a combination of dinoflagellates *G. catenatum* and *P. lima* in order to know the rate of gene expressions related to *C. gigas*' stress proteins (CuZnSOD, GS, GST, HSP70) and regulation of nucleic acids (P55). In the exposure bioassays under laboratory controlled conditions three treatments with different combinations of *P. lima* + *G. catenatum* were tested, using *Isochrysis galbana* as food for the control group and two exposure protocols: 24 h (acute) and 10 days (subchronic). Filtration behavior was assessed by direct counting in the microscope, and *C. gigas*' response in the presence of microscopic dinoflagellates was observed in the stereoscope. Total RNA was extracted to synthesize cDNA, used as template in PCR amplifications for expression analysis. The results showed that *C. gigas* completely filtered *G. catenatum* at 12 hours of exposure in the three treatments, while filtering of the dinoflagellate *P. lima* was declining and it was not completely consumed by the oyster; this behavior was observed throughout all the bioassay. Likewise, formation of pseudofaeces was appreciated only for this species, mainly reflected in treatments with higher cell density of *P. lima*. *C. gigas* juveniles apparently did not show severe physiological responses or mortality. In the analysis of amplicons by PCR endpoint, gene expression was mainly reflected in acute exposure with critical points of higher or lower modulation at 6 and 12 h, reaching the behavior of the gene expression observed in the control group at 72 h, reflecting the resilience of *C. gigas*' antioxidant system to stress. Significant differences were observed for GS, GST, and P55 mainly in T2 and T3 that had experimental conditions of higher concentration of *P. lima* (1500 and 3000 cells mL<sup>-1</sup>) showing similarities between them in gene expression effect; the results showed similar behavior to the effect of *P. lima* obtained in previous studies of individual exposure to this species, suggesting that this dinoflagellate represents a higher toxic risk to *C. gigas* than *G. catenatum*. Contrasting the effect of the combined exposure to the toxic dinoflagellates *G. catenatum* and *P. lima* with previous studies of individual exposure of the molecular genetics group, a synergistic response was observed in SOD, while an antagonistic behavior was observed for the rest of the analyzed genes. A quantitative expression analysis by real-time PCR was performed to confirm the observed behavior in the semiquantitative gene expression analysis.

**Key words:** *Crassostrea gigas*, *Prorocentrum lima*, *Gymnodinium catenatum*, PSP, DSP, HAB, combined exposure, RT-PCR, qPCR.

## Dedicatoria

A mi Familia.

A mis padres a los que tanto quiero:

A mi madre por todo su amor, su brazo fuerte será siempre mi guía.

A mi padre, por el ejemplo de humildad y honestidad al guiarse en la vida.

A mis hermanos y hermanas que me han apoyado tanto

desde que tengo memoria, con todo mi cariño,

es una fortuna formar parte de

nuestra familia.

A ti amor.

A todas aquellas personas que con una sonrisa, una palabra

amable, un oído atento, un elogio sincero

y de las más sencillas muestras

de interés, me han

hecho tan

feliz.

## Agradecimientos

Este trabajo hubiese sido imposible sin la participación de personas e instituciones que han facilitado las cosas para que éste llegara a un feliz término. Por ello, es para mí un verdadero placer utilizar este espacio para ser justo y consecuente con ellas, expresándoles mis agradecimientos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca 243641, la cual financió el desarrollo de esta investigación.

Al CIBNOR por todas las facilidades otorgadas para el uso de sus instalaciones para la realización de esta tesis de maestría; a todos los responsables del programa de posgrado por todas las atenciones y disponibilidad. A la dirección de posgrado por la ayuda en la transportación para mi estancia en CIBNOR campus Hermosillo para la culminación de unos de los objetivos y por su apoyo económico para continuar con el trabajo.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Norma Y. Hernández-Saavedra, por su tiempo, su entusiasmo y participación activa en el desarrollo de este trabajo, muchas gracias por compartir su espacio y permitirme vivir una experiencia tan importante para mi formación profesional. Le agradezco también por sus siempre atentas y rápidas respuestas a las diferentes inquietudes surgidas durante el desarrollo de este trabajo, lo cual se ha visto reflejado en los buenos resultados obtenidos. Debo destacar, por encima de todo, su disponibilidad y paciencia, de la misma forma a Arturo P. Sierra-Beltrán. El ejemplo de la dedicación y pasión de ambos por este campo es admirable.

A mi comité tutorial, por su adecuada orientación la cual llevó a feliz término este trabajo de investigación.

Le agradezco al Dr. Arturo Sánchez Paz por recibirme y hacerme un espacio en el CIBNOR campus Hermosillo para el cumplimiento de uno de los objetivos de la tesis.

Agradezco de manera especial a la M.C Delia Irene Rojas Posadas, su amabilidad y disponibilidad, durante la cual tuve todo el soporte profesional y logístico para alcanzar los objetivos perseguidos. Muchas gracias Delia!

A la Teacher Diana Dorantes por su constante empeño en que le dedicara tiempo y esfuerzo para cumplir con el requisito del inglés, y por su apoyo en la edición del Abastrac de esta tesis.

A mi hermosa novia Miriam, gracias por acompañarme en todos los momentos de esta etapa en la que tuvimos la fortuna de coincidir y de recorrer juntos hasta alcanzar la meta anhelada, dándome el ánimo y la entereza para navegar a salvo a través de ésta, bendigo el día en que tú llegaste a mi vida, brindándome un espacio en la tuya, me siento profundamente agradecido de que el sol hubiese salido sobre nosotros iluminando nuestro camino.

A mis compañeros de maestría: Cinthya, Viri, Carmen por compartir sus anhelos, por los ánimos mutuos y por la amistad que se formó entre nosotros, Matus, Carlos, por hacer ameno los días de clase y el trabajo en el lab y al resto de los compañeros por los días de diversión, a mis compañeros de laboratorio, por responder a mis dudas y por el apoyo profesional y moral de todos ellos.

A Horacio Sandoval, por su apoyo en todo momento y disposición amable para la conexión a la red del CIBNOR y su apoyo para el correcto funcionamiento de los medios audiovisuales.

A mi amiga Alondra por su amistad sincera, por sus ánimos y regaños cuando fueron necesarios.

A todas las personas que directa o indirectamente contribuyeron en la elaboración de esta tesis y que en este momento no los tengo presentes, gracias.

Y, por supuesto, el agradecimiento más profundo y sentido va para mi familia. Sin su apoyo, colaboración e inspiración habría sido imposible llevar a cabo esta etapa final. A mis padres, Regina y Andrés, por su ejemplo de lucha y honestidad; a mis hermanos Octavio, Eugenia, Obdulia, Araceli, María de los Ángeles, René por el gran apoyo moral en lo que llevo de vida y seguro estoy que será por siempre, por ellos... para ellos!!!

Soy entre todos, una persona afortunada.

**A todos ellos... simplemente, gracias!!!**



## CONTENIDO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	x
<b>LISTA DE GRÁFICAS</b> .....	xi
<b>1. Introducción</b> .....	1
<b>2. Antecedentes</b> .....	4
2.1 Características generales de <i>Crassostrea gigas</i> . ....	4
2.2 Pesquería y cultivo de <i>C. gigas</i> .....	6
2.3 Floraciones Algales Nocivas (FAN) .....	8
2.3.1 Toxinas paralizantes (PSP).....	11
2.3.2 Toxinas diarreicas (DSP).....	13
2.4 Eventos de mareas rojas en México .....	14
2.5 Estado de conocimiento de la respuesta molecular de moluscos bivalvos a la exposición de FAN.....	16
2.5.1 <i>Gymnodinium catenatum</i> .....	19
2.5.2 <i>Prorocentrum lima</i> .....	20
2.6 Genes de interés en la respuesta de exposición de <i>C. gigas</i> a dinoflagelados tóxicos	21
<b>3. Justificación</b> .....	24
<b>4. Hipótesis</b> .....	26
<b>5. Objetivos</b> .....	26
5.1 Objetivo general .....	26
5.2 Objetivos específicos .....	26
<b>6. Materiales y métodos</b> .....	27
6.1 Planteamiento de la investigación. ....	27
6.2 Juveniles de <i>C. gigas</i> .....	28
6.3 Microalgas.....	28
6.4 Cultivo de dinoflagelados .....	28
6.5 Diseño experimental.....	29
6.5.1 Bioensayo de juveniles de 5-6 mm de <i>C. gigas</i> .....	29
6.6 Laboratorio Húmedo de Seguridad Biológica.....	31
6. 7 Filtración de dinoflagelados por <i>C. gigas</i> .....	31
6.8 Extracción y procesamiento del ARN total.....	32
6.8.1 Aislamiento de ARN .....	32
6.8.2 Cuantificación y análisis de integridad del ARN .....	32

6.9 Síntesis de ADNc .....	33
6.10 Extracción de ADN .....	33
6.11 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) análisis semicuantitativo de genes involucrados en diferentes rutas metabólicas (RT-PCR) .....	34
6.12 Análisis de expresión cuantitativa de genes relacionados con distintas rutas metabólicas.....	36
6.12.1 Estandarización de qPCR .....	36
6.12.2 Análisis de expresión cuantitativo de genes de proteínas de estrés .....	37
6.13 Análisis estadísticos .....	38
<b>7. Resultados</b> .....	<b>40</b>
7.1 Análisis de las unidades experimentales y determinación de la respuesta de <i>C. gigas</i> en la alimentación, como resultado de la exposición combinada a dinoflagelados tóxicos .....	40
7.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): análisis semicuantitativo de genes involucrados en la síntesis de proteínas de estrés y regulación de ácidos nucleicos .....	43
7.2.1 Extracción y verificación de ARN total .....	43
7.2.2 Síntesis de ADNc .....	45
7.2.3 Análisis de la expresión de genes de respuesta a estrés y de regulación de ácidos nucleicos mediante RT-PCR .....	47
7.2.4 Contraste de análisis de expresión a exposiciones individualizadas de <i>C. gigas</i> a <i>G. catenatum</i> y <i>P. lima</i> .....	52
7.2.5 Análisis específico mediante qPCR tiempo real de genes de respuesta a estrés..	55
7.2.5.1 Estandarización de reacción de qPCR.....	55
7.2.5.2 Análisis cuantitativo de expresión mediante qPCR .....	57
<b>8. Discusión</b> .....	<b>61</b>
8.1 Respuesta de <i>C. gigas</i> en la alimentación. ....	61
8.2 Expresión génica. ....	67
<b>9. Conclusiones</b> .....	<b>82</b>
<b>10. Bibliografía</b> .....	<b>84</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribución mundial de ostión Japonés, <i>Crassostrea gigas</i> .....	4
<b>Figura 2.</b> Ostión Japonés, <i>C. gigas</i> .....	5
<b>Figura 3.</b> Descripción anatómica interna de <i>C. gigas</i> .....	6
<b>Figura 4.</b> Esquema simplificado de la secuencia principal de la sucesión fitoplanctónica..	9
<b>Figura 5.</b> Organismo reto: <i>Gymnodinium catenatum</i> .....	20
<b>Figura 6.</b> Organismo reto: <i>Prorocentrum lima</i> .....	20
<b>Figura 7.</b> Representación esquemática del sistema de exposición simulando de manera simplificada la dinámica del hábitat natural de <i>C. gigas</i> durante un evento de FAN.....	27
<b>Figura 8.</b> Lote de juveniles de <i>C. gigas</i> del que se seleccionaron los organismos para el bioensayo (talla de 5-6 mm) .....	30
<b>Figura 9.</b> Análisis microscópico (aumento 10X) del agua de las unidades experimentales durante el bioensayo .....	41
<b>Figura 10.</b> Perfil electroforético en gel de agarosa/Synergel 1% en TBE-DEPC del ARN total obtenido de muestras del bioensayo de exposición de <i>C. gigas</i> a la combinación de dinoflagelados tóxicos <i>P. lima</i> y <i>G. catenatum</i> .....	43
<b>Figura 11.</b> Perfil electroforético en gel de agarosa/Synergel al 1% en TBE 1X de productos de PCR directo usando como templado ARN de <i>C. gigas</i> .....	45
<b>Figura 12.</b> Perfil electroforético de productos de amplificación usando cebadores para el gen 28S ribosomal de <i>C. gigas</i> para verificar la correcta síntesis de ADNc.....	46
<b>Figura 13.</b> Análisis de expresión de genes de proteínas de respuesta a estrés de <i>C. gigas</i> , expuesto a tres tratamientos (combinación de <i>G. catenatum</i> y <i>P. lima</i> ) mediante RT-PCR semicuantitativo .....	48
<b>Figura 14.</b> Expresión relativa mediante la técnica de RT-PCR semicuantitativo del gen P55 involucrado en la regulación de ácidos nucleicos y la división celular .....	50
<b>Figura 15.</b> Contraste del efecto de la exposición combinada de dinoflagelados tóxicos <i>G. catenatum</i> y <i>P. lima</i> (PSP+DSP) .....	53
<b>Figura 16.</b> Curvas estándar de algunos genes analizados por PCR tiempo real .....	56

**Figura 17.** Análisis de expresión relativa mediante la técnica de qPCR de genes involucrados en la síntesis de proteínas de estrés .....58

**Figura 18.** Expresión relativa del gen P55 mediante qPCR.....60

## LISTA DE TABLAS

**Tabla I.** Clasificación taxonómica de *Crassostrea gigas* .....4

**Tabla II.** Resumen de resultados preliminares en trabajos desarrollados por el Grupo de Genética Molecular del CIBNOR.....22

**Tabla III.** Genes de interés y su función bioquímica.....23

**Tabla IV.** Matriz experimental para exposición aguda y sub-crónica de juveniles de *C. gigas* a organismos productores de toxinas DSP y PSP. ....30

**Tabla V.** Grupo de genes relacionados con la síntesis de proteínas de estrés evaluado mediante RT-PCR.....35

**Tabla VI.** Gen evaluado para el control de expresión .....35

**Tabla VII.** Resumen de planteamiento de hipótesis del análisis estadístico .....39

**Tabla VIII.** Características del ARN obtenido de muestras del bioensayo de exposición de *C. gigas* a la combinación de dinoflagelados tóxicos del bioensayo de exposición a *P. lima* y *G. catenatum*.....44

**Tabla IX.** Características del ADNc obtenido del bioensayo de exposición a *P. lima* y *G. Catenatum*.....46

**Tabla X.** Resumen de resultados del análisis estadístico *a posteriori* mediante el test de Tukey para el análisis de expresión de algunos genes involucrados en la síntesis de proteínas de estrés y de regulación de ácidos nucleicos en *C. gigas* expuesto a una combinación de los dinoflagelados tóxicos *P. lima* y *G. catenatum* mediante la técnica de PCR semicuantitativo (RT-PCR).....51

**Tabla XI.** Concentraciones de dinoflagelados usadas en bioensayos de exposición unialgal o combinada.....52

**Tabla XII.** Resumen del efecto de la exposición combinada de *C. gigas* a dinoflagelados tóxicos productores de toxinas.....54

**Tabla XIII.** Resumen de la estandarización y validación de reacción de PCR en tiempo real a partir de diluciones seriadas de ADNc obtenido de un pull de 5 semillas de *C. gigas* para algunos de los genes analizados.....57

**Tabla XIV.** Resumen de resultados de análisis estadístico *a posteriori* mediante el test de Tukey para el análisis de expresión de algunos genes involucrados en la síntesis de proteínas de estrés y de regulación de ácidos nucleicos en *C. gigas* expuesto a una combinación de los dinoflagelados tóxicos *P. lima* y *G. catenatum* mediante la técnica de qPCR.....59

## LISTA DE GRÁFICAS

**Gráfica 1.** Producción (en millones de Tm) de *C. gigas* procedentes de la pesca (derecha) y de la acuicultura (izquierda), desde 1950 a 2010.....7

**Gráfica 2.** Filtración de las células de los dinoflagelados tóxicos por juveniles de *C. gigas* en bioensayos de exposición combinada. ....42

## 1. Introducción

El ostión del Pacífico u ostión japonés, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), es uno de los moluscos bivalvos de mayor importancia económica en el mundo, con una producción promedio anual de 4.2 millones de Tm y un valor comercial de 3.5 billones de dólares (Dheilly *et al.*, 2011). Esta especie, también es uno de los mejores modelos de estudio científico dentro del grupo de los bivalvos, del que se han desarrollado estudios de caracterización: bioquímica (Estrada *et al.*, 2007a; Campa-Córdoba *et al.*, 2009; Escobedo-Lozano *et al.*, 2012), molecular (Hatanaka *et al.*, 2009; López-Flores *et al.*, 2010; Deleury *et al.*, 2012) y genética (Samain *et al.*, 2007; Flórez-Barros *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012). *C. gigas*, junto con otras especies de bivalvos, juega un papel importante en el mantenimiento de la calidad del agua en estuarios y ambientes marinos costeros, por lo que se le considera un modelo de estudio científico de gran importancia económica (Dheilly *et al.*, 2011).

A través de la historia de su cultivo, la producción de bivalvos se ha favorecido por la acumulación de conocimiento y avances tecnológicos. Por ejemplo, los aspectos técnicos del cultivo del ostión han sido objeto de una extensa investigación científica en la que el objetivo central ha sido mejorar el rendimiento de su producción acuícola (Hedgecock *et al.*, 2009). En países como China, Japón y Francia, su cultivo depende tanto de la producción de larvas (bajo condiciones controladas) como de la captura de semilla silvestre (Álvarez, 2009).

En el noroeste de México, desde su introducción en los años setentas del siglo pasado, el cultivo del ostión se ha consolidado, sin embargo, como en otras partes del mundo han surgido diversos problemas relacionados con mortalidades masivas tanto de larvas como de adultos. Se han identificado factores bióticos y abióticos como causantes de este problema, encontrándose que estos factores podrían tener una interacción u efecto mayor o menor con los organismos, dependiendo de su condición metabólica, reproductiva y genética (Samain *et al.*, 2007). Ante esta problemática, se han propuesto investigaciones relacionadas con los aspectos fisiológicos, de nutrición, inmunología, genética y desarrollo larvario, con el fin de conocer las condiciones óptimas de su cultivo y manejo, para evitar

las altas tasas de mortalidad (Llera-Herrera, 2008). En la costa noreste de E.U., se tienen el registros de severas mortandades en ostiones juveniles de *Crassostrea virginica*, además de otras especies entre las cuales está incluida *C. gigas*. Se establecieron varias hipótesis como posibles causas primarias de la mortandad, entre las que destaca la presencia de algún agente tóxico de origen bacteriano o microalgal o alguna alteración físico-química (Malham *et al.*, 2009). Simultáneamente al inicio las mortandades ocurrieron fenómenos de Floraciones Algales Nocivas (FAN) del dinoflagelado desnudo *Akashiwo sanguinea* (Bricelj *et al.*, 1992).

Las mareas rojas ó floraciones algales nocivas, FAN (HABs, por sus siglas en ingles–Harmful Algal Blooms-), son episodios que ocurren de manera natural en el medio marino cuando las microalgas alcanzan concentraciones extremadamente elevadas, ocasionando una discoloración del agua (Sierra-Beltrán *et al.*, 2004). Este tipo de eventos es causado por diversos microorganismos, algunas especies pueden ser nocivas incluso a bajas densidades, es decir, sin llegar a formar “blooms” ó discoloración del agua que haga evidente su presencia. Los efectos causados por las FAN en los recursos pesqueros ó en los cultivos de moluscos y peces, pueden ser devastadores tanto desde el punto de vista económico, debido a vedas impuestas a su extracción y consumo, como por el daño fisiológico que les pueden ocasionar a los organismos (Landsberg, 2002).

En los moluscos bivalvos la bioacumulación de toxinas es un factor biótico de suma importancia, ya que se ha observado que ante la presencia de especies de microalgas tóxicas, en el bivalvo pueden generarse condiciones de estrés con la consecuente reducción en la producción. Lo anterior podría ser uno de los factores del incremento de mortandades masivas en espacios de cultivo, además de los efectos a la salud humana por la calidad de los productos, ya que algunas toxinas afectan solamente al consumidor (GEOHAB, 2001).

Para conocer los efectos negativos del fitoplancton nocivo en moluscos bivalvos, se han desarrollado investigaciones en las que los bivalvos son expuestos a microalgas tóxicas o productoras de toxinas (en modelos de exposición especie-especie), basando los diseños experimentales y las variables consideradas al registro de datos de comportamiento y de respuesta fisiológica tales como: cierre de valvas (Hégaret y Wikfors, 2005), disminución en la tasa de filtración (Hégaret *et al.*, 2007), tasa de crecimiento del bivalvo (Glibert *et al.*,

2007), formación de pseudoheces (Wikfors y Smolowitz, 1995), así como observaciones histológicas en tejidos (Galimany *et al.*, 2008) y respuestas bioquímicas (Estrada *et al.*, 2007b; Campa Cordova *et al.*, 2009), mientras que los estudios moleculares son escasos, particularmente aquellos de expresión genética (Romero Geraldo y Hernández-Saavedra, 2012).

Debido a que se han identificado episodios FAN en localidades próximas de áreas naturales y de cultivo de ostión japonés previo a los sucesos de mortalidad (Bricelj *et al.*, 1996; Herrera-Sepúlveda *et al.*, 2008), en este trabajo se pretende generar información básica a partir de un modelo complejo de exposición, usando como modelo al molusco bivalvo *C. gigas* y a dinoflagelados tóxicos presentes frecuentemente en eventos FAN de la region noroeste de México: *Prorocentrum lima* (Ochoa *et al.*, 1997; COFEPRIS, 2010; Gárate-Lizarraga, 2006) y *Gymnodinium catenatum* (Garate-Lizarraga *et al.*, 2002; Band-Schmidt *et al.*, 2005).

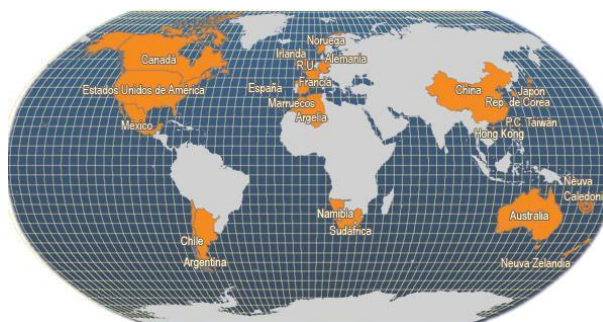
En este trabajo, para el estudio del efecto de la exposición a organismos FAN a nivel de expresión genética, se consideraron como genes blanco algunos que codifican proteínas de estrés tales como: Glutamina Sintetasa (GS); Glutación-S-Transferasa (GST); Proteína de Shock termico 70 (Heat Shock Protein 70 ó HSP<sub>70</sub>) y Superóxido Dismutasa tipo Cu/Zn (Cu/ZnSOD), así como el gen que codifica la subunidad 1 del factor de ensamblaje P55 de la cromatina (P55), considerando como variables el tiempo de exposición (exposición aguda y sub-crónica) y la combinación de tres concentraciones celulares de dos especies de dinoflagelados tóxicos. El efecto de la exposición de juveniles de *C. gigas* a dinoflagelados productores de toxinas, permitirá identificar si las rutas metabólicas seleccionadas son modificadas ante la presencia de estas microalgas, documentadas como responsables de eventos tóxicos asociados preliminarmente a las altas tasas de mortalidad registradas en los ostiones.



## 2. Antecedentes

### 2.1 Características generales de *Crassostrea gigas*

El ostión japonés, *C. gigas*, es una especie de molusco bivalvo eurihalino, hermafrodita secuencial, con ciclos reproductivos estacionales. Su distribución original se restringe a las costas de Japón, sin embargo, durante el siglo pasado fue introducido masivamente en diversos sitios costeros de la franja templada y subtropical en prácticamente todos los océanos del mundo (Fig. 1), debido a su plasticidad fenotípica que le brinda capacidad adaptativa a distintos ambientes. Este molusco es típico de esteros, estuarios y lagunas costeras, donde la concentración de materia orgánica en el agua es alta, distribuyéndose desde la zona intermareal hasta los 40 metros de profundidad (Gallo *et al.*, 2001).



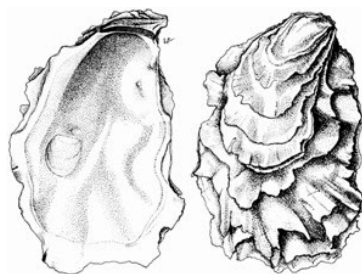
**Figura 1.** Distribución mundial de ostión Japonés, *Crassostrea gigas* (tomado de FAO, 2006).

La taxonomía de los moluscos es compleja y ha sido causa de controversia (Huvet *et al.*, 2002). Los criterios anatómicos constituyen los principales ejes de la clasificación, mientras que la distribución geográfica y el hábitat son criterios secundarios; la plasticidad fenotípica hace que la determinación a nivel de especie sea más compleja aún (Graf, 2000). El ostión japonés se agrupa dentro de la familia *Ostreidae*, la cual incluye tres géneros: *Crassostrea*, *Ostrea* y *Pycnodornia* (Tabla I).

**Tabla I.** Clasificación taxonómica de *C. gigas*.

Phylum:	<i>Mollusca</i>
Clase:	<i>Bivalvia</i>
Orden:	<i>Pterioida</i>
Familia:	<i>Ostreidae</i>
Género:	<i>Crassostrea</i>
Especie	<i>gigas</i>

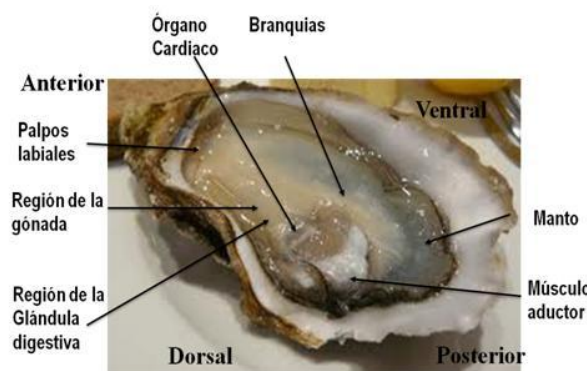
La concha es sólida de color blanquecino-opaco a amarillo-cremoso con manchas purpuras, extremadamente rugosa y laminada y tiende a ser alargada; la valva izquierda (inferior) es profundamente cóncava y termina en pliegues, mientras que la valva derecha (superior) es plana o ligeramente convexa, apoyándose dentro de la izquierda (Fig. 2).



**Figura 2.** Ostión Japonés, *C. gigas*.

(Tomado de [www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea\\_gigas/es](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/es))

En cuanto a la anatomía interna (Fig. 3), el cuerpo se encuentra envuelto por el manto, que está involucrado en la síntesis de la concha y en las funciones sensoriales, pues el organismo es capaz de presentar retracción ante estímulos nerviosos (Ruppert y Barnes, 1995). La masa encefálica está ausente; el estómago es utilizado en la digestión del alimento y continúa en un intestino y un recto hasta el ano. La glándula digestiva es un órgano que rodea al estómago. *C. gigas* posee un par de branquias lamelares que se extienden en la región ventral (desde la boca hasta el ano) con función respiratoria, excretora y nutritiva. Posee un órgano muscular (músculo abductor) empleado para la apertura y cierre de las valvas. Las branquias también presentan tejido muscular, lo que permite mantener la circulación de la hemolinfa (carente de pigmentos transportadores de oxígeno). La hemolinfa es impulsada por el corazón, ubicado en la cavidad pericardíaca, adyacente al músculo abductor. El corazón impulsa la hemolinfa a través de arterias que humedecen los órganos, y la hemolinfa es colectada posteriormente en senos venenosos para su paso a través de las branquias (FAO, 2006).



**Figura 3.** Descripción anatómica interna de *C. gigas* (López-Cuevas, 2013).

Para obtener su alimento, el ostión japonés hace pasar el agua a través de sus branquias, reteniendo la materia orgánica en su sistema digestivo, por lo que en sistemas costeros tiene un importante rol trófico como organismo filtrador (Cognie *et al.*, 2006). Este ostión filtra el alimento del agua y lo dirige hacia los palpos labiales donde se clasifica antes de pasar a la boca; los bivalvos tienen la capacidad de seleccionar alimentos filtrados del agua. El bolo alimenticio, amalgamado por el moco, pasa a la boca y a veces es rechazado por los palpos labiales y eliminado en forma de las denominadas pseudoheces (Helm *et al.*, 2006).

En bivalvos, la capacidad de selección pre-ingestiva de partículas está asociada a la detección de metabolitos secundarios (Espinosa *et al.*, 2007), sin embargo, debido a su característica de filtrador el ostión retiene todo tipo de partículas sólidas, muchas de las cuales son flóculos sedimentarios que pueden transportar cualquier cantidad de sustancias tóxicas, como las toxinas marinas que están presentes en diversas especies de microalgas (Bricelj y Shumway, 1998).

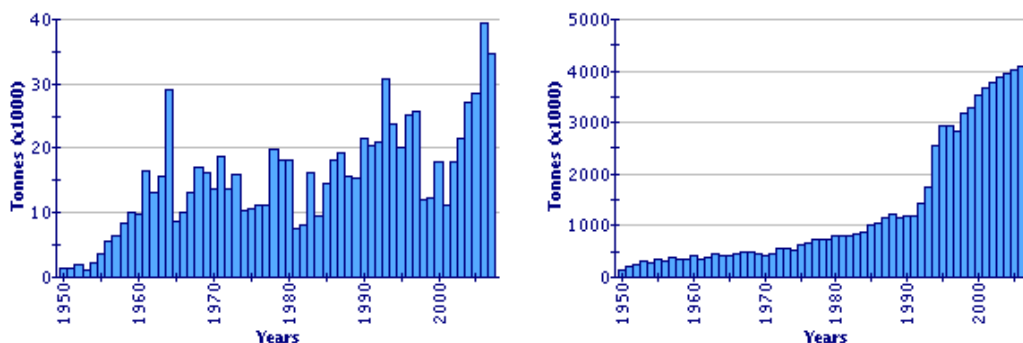
## 2.2 Pesquería y cultivo de *C. gigas*

Los moluscos bivalvos (ostras, mejillones, almejas y vieiras) constituyen una parte importante de la producción pesquera mundial (Corral *et al.*, 2000). Especies como *C. gigas* han sido muy estudiadas en cultivo controlado, cultivo de engorda y en poblaciones naturales sometidas a extracción. La producción de *C. gigas* muestra una gran dispersión geográfica, ha superado a la producción de ostras nativas por razones tales como: resistencia a enfermedades que atacan a las ostras del género *Ostrea*, plasticidad fenotípica

que le permite crecer en una amplia gama de temperaturas y salinidades de cultivo, altas tasas reproductivas, y mayores tasas de filtración, en los periodos de alta abundancia de alimento, lo que contribuye a que esta ostra sea la más estudiada a nivel mundial (Farías, 2008).

Si bien la explotación de bancos naturales de bivalvos continuará siendo importante, gran número de poblaciones naturales se encuentran cerca de los límites máximos sostenibles, situación que puede atenuarse a través de la acuicultura, que ofrece una alternativa a la explotación de las poblaciones naturales (Álvarez, 2009). La atracción del cultivo de esta especie surge por el tamaño que alcanza en un periodo relativamente corto de tiempo (12 meses), además de su gran tolerancia a condiciones ambientales como la temperatura (15-18°C, con un máximo de 24°C y límite de sobrevivencia de 30°C) y la salinidad (15-32 ‰) (Almeida y Manchado, 1997).

Durante el período 1991-2000, los desembarques procedentes de la pesca apenas aumentaron en 2.5-3.5 millones de Tm, mientras que durante el mismo período los desembarques procedentes del cultivo se duplicaron, aumentando de 6,3 a 14 millones de Tm (Gráfica I). Para el año 2000, alrededor del 75% de la producción mundial de bivalvos procedía de alguna forma de cultivo, con una tendencia a seguir aumentando (FAO, 2008).



**Gráfica 1.** Producción (en millones de Tm) de *C. gigas* procedentes de la pesca (derecha) y de la acuicultura (izquierda), desde 1950 a 2010 (tomado de los Anuarios de Estadísticas de Pesca de la FAO).

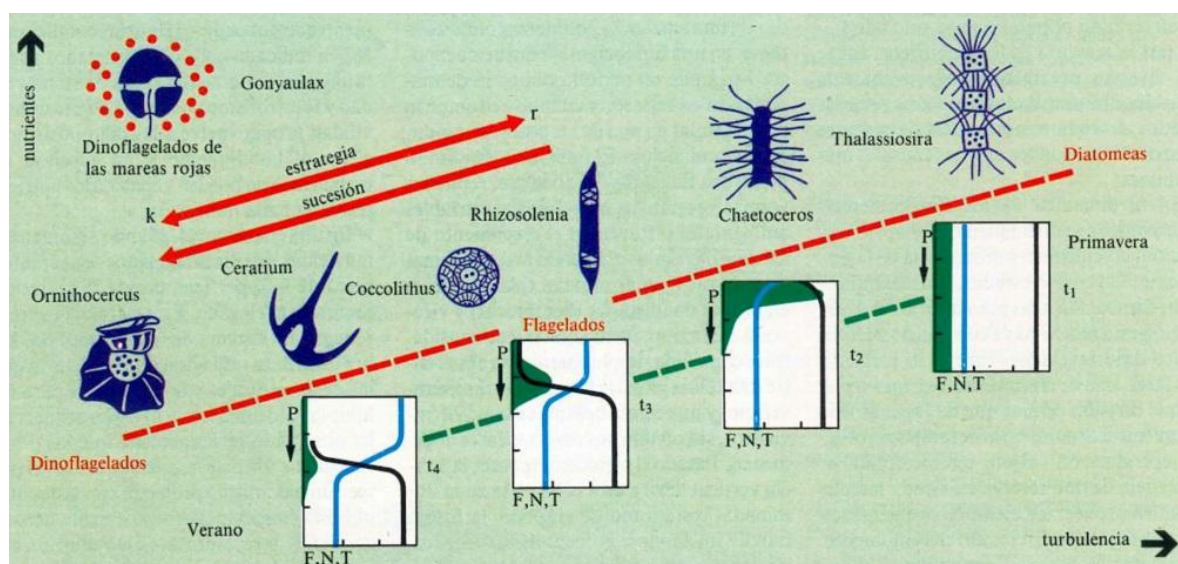
El ostión japonés fue introducido principalmente en el litoral del Pacífico Mexicano, abarcando a los estados de Sonora, Sinaloa, Nayarit, Baja California y Baja California Sur. En el 2006 México reportó una producción de 1,479 Tm, constituyendo el 0.03% de la producción mundial (FAO, 2006). Por lo tanto, el cultivo de *C. gigas* representa una actividad con gran importancia económica en nuestro país, donde las técnicas de producción de larvas y semilla han sido totalmente desarrolladas (Mazón-Suastegui, 1996). La introducción de *C. gigas* en Baja California Sur fue llevada a cabo en 1976 y, en comparación con la producción pecuaria y agrícola, la producción pesquera tiene un papel muy importante en la economía del estado (Mazón-Suastegui, 1996).

En su medio natural y en espacios de cultivo, los moluscos bivalvos por su carácter filtro-alimentador, pueden ingerir microalgas productoras de toxinas marinas que forman parte de los organismos que producen los eventos de floraciones algales nocivas (FAN), llegando a provocar mortandades masivas de estos organismos, resultando en pérdidas económicas para las pesquerías y granjas, tanto por la merma de producto como por las vedas impuestas a su extracción y consumo (GEOHAB, 2001).

### **2.3 Floraciones Algales Nocivas (FAN)**

Las FAN se definen conceptualmente como “aquellos eventos nocivos y/o tóxicos de microalgas que causan efectos negativos a la salud pública, a las actividades pesqueras, a la acuicultura y al turismo, en el ambiente acuático” (Clément y Lembeye, 1994). Entre los principales organismos causantes de FAN, figuran cianobacterias, diatomeas y dinoflagelados. Se considera una FAN, a la acumulación masiva de una o más especies que coexistan con densidades de  $10^4$  a  $10^6$  cel mL<sup>-1</sup>, y que forman el 95-99% de la biomasa total fitoplanctónica. También se considera FAN cuando el fitoplancton excede 100 mg de clorofila m<sup>-3</sup> si las células miden más de 30 µm y su abundancia es mayor a 1000 cel mL<sup>-1</sup>, o cuando se trata de diatomeas y constituyen más del 65 % de la muestra, lo que generalmente causa notorias discoloraciones del agua, debido a los pigmentos que poseen estos organismos. Sin embargo, no todos los florecimientos algales son rojos, ya que su coloración (amarilla, café, naranja, verde, etc.) depende de los pigmentos presentes en los microorganismos responsables de tales florecimiento (Alonso-Rodríguez *et al.*, 2004).

Los sistemas de floración han sido descritos como ecosistemas en sí, ya que presentan una estructura propia coherente. Estos ecosistemas muestran una variabilidad importante a varias escalas de espacio y tiempo. Las diferencias en el medio ambiente físico relacionadas con los ritmos de intensificación y relajación del florecimiento, así como la circulación y contribución de las diferentes masas de agua, se reflejan en las comunidades de fitoplancton (Fig. 4). Los dinoflagelados formadores de FAN generalmente no están adaptados para la asimilación de nutrientes en bajas concentraciones (por su bajo coeficiente de afinidad de nutrientes) comparado con otros grupos de fitoplancton como diatomeas y rafidofitas (Hernández-Becerril *et al.*, 2010). Los dinoflagelados requieren assimilar mayores concentraciones de nutrientes; esto es paradójico, ya que la formación de un FAN de dinoflagelados se da en condiciones de baja concentración de nutrientes, cuando la columna de agua se ha estabilizado (Margalef, 1978).



**Figura 4.** Esquema simplificado de la secuencia principal de la sucesión fitoplanctónica. Se observa el sucesivo reemplazo de formas de vida que imponen su estrategia reproductiva ( $r$ ) en un ambiente rico en recursos, por otras más eficientes ( $k$ ) capaces de explotar los medios cada vez más pobres en nutrientes impuestos por el consumo y la limitación de la mezcla vertical. La sucesión de especies es causada, y corre paralela a la disminución de nutrientes y turbulencia de la capa iluminada. Los dinoflagelados formadores de mareas rojas son solo componentes menores de esa secuencia principal. Su estrategia está diseñada para explotar ambientes “anómalos” donde se combinan elevadas concentraciones de nutrientes con baja turbulencia. Para diversos tiempos,  $t_i$ , se esquematiza la concentración de nutrientes, N (línea negra), la temperatura, T (línea azul), y la abundancia de fitoplancton (tomado de Margalef, 1978).

En algunas ocasiones no es necesaria una proliferación masiva de las especies para que el fenómeno represente un peligro real para la salud humana (Hernández-Orozco y Gárate-Lizárraga, 2006), algunas especies producen baja concentración de toxina, debiendo de contar con miles de células por litro para causar un cuadro de intoxicación, mientras que otras como *Dinophysis* y *Alexandrium* resultan ser muy tóxicas a bajas concentraciones celulares. De las más de 2,000 especies estimadas para el grupo de los dinoflagelados, unas 300 son capaces de presentarse en elevadas concentraciones formando eventos FAN, pero únicamente alrededor de 75 tienen la capacidad de producir potentes toxinas y causar intoxicaciones en humanos, que son potencialmente letales (Hallegraeff, 1995). En la actualidad, los FAN han cobrado una connotación alarmante a nivel mundial debido al aparente incremento en su frecuencia, intensidad y distribución geográfica (Hernández-Orozco y Gárate-Lizárraga, 2006). Sin embargo, esta apreciación también se debe al aumento en el conocimiento que se tiene del tema, de sus efectos en la acuicultura, del conocimiento de los procesos de eutrofización y/o del transporte de quistes en el lastre de las embarcaciones.

Por el daño al ambiente que provocan, las algas nocivas han sido clasificadas en dos categorías principales (GEOHAB, 2001; Anderson, 2007):

a) *Floraciones no tóxicas*, incluyen aquellos organismos que crecen a densidades tales que discoloran el agua y ocasionan la depleción de oxígeno provocando anoxia, ya sea durante la fase oscura de la fotosíntesis ó por la excesiva proliferación de bacterias durante el decaimiento del florecimiento, así como la producción de excesiva cantidad de moco provocando daño mecánico en branquias ocasionando la muerte de peces y moluscos.

b) *Floraciones tóxicas*, que consideran a los organismos productores de toxinas, que al ser consumidos promueven la acumulación de toxinas en los tejidos del consumidor transfiriendo las toxinas a otros organismos a través de la red trófica.

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

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

### **2.3.1 Toxinas paralizantes (PSP)**

Las toxinas PSP, son sustancias neurotóxicas que actúan directamente sobre el sistema nervioso periférico y el músculo esquelético; afectan la actividad de la membrana celular mediante el bloqueo selectivo de los canales de transporte de sodio (Wiese y D'Agostino, 2010). En la actualidad, se conoce la estructura de más de 20 toxinas asociadas a este síndrome (PSP), siendo la saxitoxina la primera toxina PSP caracterizada químicamente, la más tóxica y estudiada (Shantz *et al.*, 1957; Asakawa *et al.*, 2005). El núcleo de la molécula corresponde a una tetrahidropurina altamente soluble en agua, estable a pH ácido y que no se destruye por efecto del calor (Shantz, 2006); los principales responsables de la producción de este tipo de toxinas en climas templados son los dinoflagelados del género *Alexandrium* (FAO, 2005).

La mayoría de los moluscos bivalvos que se alimentan por filtración son relativamente insensibles a las toxinas PSP por que las STX y otras toxinas de este tipo bloquean con mucha afinidad y selectivamente canales de sodio, y los bivalvos en general cuentan con nervios y músculos operados principalmente por canales de calcio activados por voltaje; esto permite a los moluscos continuar con su alimentación y acumular grandes cantidades de toxinas (Kao, 1993). Al alimentarse, los moluscos bivalvos transfieren las partículas de alimento de las branquias al estómago y, mediante la digestión, las toxinas PSP se liberan y llegan a los órganos digestivos. Si ocurre un florecimiento tóxico, haya o no discoloración del agua, los moluscos que habitan esa área pueden concentrar toxinas PSP (96% de la toxicidad total se encuentra en las vísceras, que generalmente constituyen un 30% del peso total de tejido), variando según la cepa y la especie del dinoflagelado en cuestión, así como la concentración de células en el evento tóxico (Mons *et al.*, 1998).



Los canales de sodio dependientes del voltaje consisten de una proteína de  $\approx 250$  kDa que atraviesa la membrana plasmática de muchas células excitables. Se caracteriza por una conducción uniforme, depende del potencial y presenta selectividad iónica. Una vez que la célula se despolarizó correctamente, la conformación de la molécula del canal de sodio cambia. Se abre un canal acuoso que permite mediante fuerzas electroquímicas el desplazamiento del ion  $\text{Na}^+$  de la fase extracelular hacia el interior de la célula. El flujo de sodio hacia el interior de la célula causa un aumento de la fase del potencial de acción. Las membranas también presentan canales de sodio dependientes del voltaje que, cuando se abren, permiten el desplazamiento  $\text{K}^+$  intracelular hacia afuera, con la consecuente repolarización (FAO, 2005). Así, el bloqueo de los canales de sodio daña el funcionamiento celular, inhibiendo las señales eléctricas que mantienen trabajando toda la actividad nerviosa superior vegetativa así como la comunicación sináptica. En ausencia de apoyo respiratorio intensivo, la muerte puede ocurrir por parálisis respiratoria y por compromisos cardíacos y del sistema nervioso central. Los canales de sodio están presentes en casi todas las células de mamíferos, aves, peces, anfibios e invertebrados, tanto en fibras del músculo esquelético como en fibras del músculo cardíaco (Wiese, 2010). La duración del bloqueo del canal está relacionada reversiblemente con la concentración de toxinas y depende de la constante de asociación (Mons *et al.*, 1998).

Las toxinas PSP constituyen un grupo de compuestos de la tetrahidropurina estrechamente relacionados, que se dividen en 4 subgrupos: 1) carbamato (STX, neoSTX y GNTX1-4); 2) N-sulfo-carbamoil (GNTX5-6, C1-4); 3) decarbamoil (dcSXT, dcneoSXT, dcGNTX1-4) y 4) desoxicarbamoil (doSXT, doneoSXT y doGNTX1); la toxicidad de estas toxinas varía ampliamente, siendo las del grupo carbamato las más tóxicas (FAO, 2005). Las toxinas PSP se encuentran en algunos géneros de dinoflagelados y en algunas especies de cianobacterias. Las especies del género *Alexandrium* (sin, *Gonyaulax* o *Protogonyaulax*) identificadas como contaminantes de moluscos son: *A. tamarensis*, *A. minutum* (sin. *A. excavata*), *A. catenella*, *A. fraterculus*, *A. fundyense*, *A. tamiyavanichi* y *A. cohorticula*, entre otras. Otras especies de dinoflagelados que también han sido identificados como productores de STX son *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* y *Gymnodinium*

*catenatum*; algunas cianobacterias como *Anabaena* spp. y *Cylindroespermopsis raciborski* también pueden producir saxitoxinas (FAO, 2005).

### 2.3.2 Toxinas diarreicas (DSP)

Las toxinas DSP son compuestos liposolubles que se acumulan en los tejidos adiposos de los bivalvos. La mayor acumulación de toxinas DSP ocurre en glándula digestiva (76%), gónada (12%) y branquias, manto y músculo (<12%) (Bauder *et al.*, 2001). La ingesta de organismos contaminados por acumulación de toxinas en los humanos causa la intoxicación diarreica, cuyos síntomas incluyen: diarrea, vómito y dolores abdominales. Los síntomas aparecen de 30 min a algunas horas después de la ingestión, mientras que la recuperación completa se observa dentro de un periodo de tres días; los primeros reportes de intoxicaciones diarreicas datan de 1960.

Las toxinas DSP se clasifican en tres grupos según su estructura química:

- a) Toxinas ácidas, grupo formado por varios compuestos lipofílicos que se acumulan en el tejido adiposo; el ácido okadaico (OA) y sus derivados, las dinofisitoxinas (DTX1, DTX2 y DTX3). Estos compuestos son potentes inhibidores de las serina/treonina fosfatasa tipo PP-1 y PP-2A. Esta inhibición conduce a la hiperfosforilación de las proteínas que participan en las uniones del citoesqueleto y regulan la permeabilidad de la célula, lo que resulta en una pérdida de fluidos celulares, por lo que en humanos están relacionados con la inflamación del tracto intestinal y la diarrea (Hallegraff *et al.*, 1995; Konoki *et al.*, 2010), reportándose también como teratogénicos (Maynes, 2001)
- b) Toxinas neutras, grupo compuesto por lactosas poliéter del grupo de las pectentoxinas (PTX). A la fecha se han aislado diez toxinas tipo PTX y seis de ellas (PTX1, -2, -3, -4, -6 y -7) se han identificado químicamente.
- c) Yesotoxina (YTX) que es un compuesto poliéter sulfatado, fue aislado por primera vez por Murata *et al.* (1987) de la glándula digestiva de la escalopa japonesa *Patinopecten yessoensis*. Hasta la fecha se han identificado cerca de 100 análogos de la YTX, de los cuales solo el 40 % han sido bien caracterizados en lo concerniente a su estructura química. Los diferentes compuestos análogos de la

YTX son producidos por distintas especies de dinoflagelados, sin embargo, algunos son metabolizados por los tejidos de los mariscos. Son toxinas de baja toxicidad y, en estudios experimentales con ratones, provocan episodios leves de diarrea. Por ello, actualmente se discute su inclusión entre las biotoxinas causantes del síndrome de intoxicación diarreica, por no haber afectación al humano (Rödher *et al.*, 2011).

En las células eucariotas, las proteínas Ser/Thr fosfatasas representan una clase de enzimas conservadas que catalizan la desfosforilación de residuos de fosfoserina o fosfotreonina, ya que comparten alrededor del 40% de identidad de secuencia aminoácidos en sus subunidades catalíticas. En numerosos procesos biológicos como el metabolismo del glucógeno, la regulación del ciclo celular, la contracción del músculo liso y la síntesis de proteínas, la PP1 desempeña un papel clave en la desfosforilación (Maynes, 2001). Los organismos productores de toxinas DSP son dinoflagelados de los géneros *Dinophysis* y *Prorocentrum* (Bauder *et al.*, 2001). Aunque está bien conocido el mecanismo de acción del ácido okadaico, su efecto por exposición en organismos marinos no ha sido bien documentado.

## **2.4 Eventos de mareas rojas en México**

Los florecimientos algales masivos de tipo tóxico o mareas rojas tóxicas constituyen fenómenos naturales que se han manifestado a lo largo de la historia (Ronsón-Paulín, 1999). En la época actual, su impacto en la acuicultura, pesquerías y salud humana se ha incrementado y extendido a nivel mundial, sin embargo, la distribución de las mareas rojas no se conoce con exactitud debido a que no se cuenta con bases de datos históricos y los programas de monitoreo son relativamente recientes. En nuestro país, tampoco existen bases de datos, ni programas de monitoreo establecidos y el seguimiento de los eventos ha sido ocasional y muy fragmentado a lo largo de las costas nacionales.

En el litoral Mexicano, el impacto de los florecimientos de dinoflagelados tóxicos sobre diversas especies marinas, y entre ellas los moluscos bivalvos, es un fenómeno que se ha observado con mayor frecuencia (Herrera-Sepúlveda *et al.*, 2008). Se han identificado tres géneros frecuentes, como productores de floraciones algales nocivas tóxicas para los

humanos: *Pyrodinium* (*P. bahamense* var. *compressum*), *Gymnodinium* (*G. catenatum* y *G. brevis* -*Karenia brevis*-) y *Prorocentrum* (Ochoa, 2003).

Durante la segunda mitad de la década de los noventa se registraron nuevas áreas de ocurrencia de mareas rojas, cuyo número se ha incrementado notablemente y se ha observado que especies tóxicas como *P. bahamense* var. *compressum* y *G. brevis* han ocasionado problemas económicos, ecológicos y de salud pública en estados como Guerrero, Oaxaca, Sinaloa y Veracruz (Cortés-Altamirano, 1998; Ochoa *et al.*, 1997; Herrera-Sepúlveda *et al.* 2008). En el Golfo de México se han presentado casos, particularmente en el estado de Veracruz en donde es relativamente común observar florecimientos de *G. brevis*, sin embargo, durante el otoño-invierno de 1996, la extensión y duración de estos eventos causó la veda y cierre de todas las actividades pesqueras, afectando la economía de los pescadores. En la región del Golfo de Tehuantepec, al sur del Pacífico mexicano, los eventos de mareas rojas más recientes han sido asociados con *G. catenatum* y *P. bahamense* var. *compressum* (Ochoa *et al.*, 1997).

En la región Noroeste de México, particularmente la Costa Occidental de la península de B.C.S. y Golfo de Baja California, la mayoría de estos eventos han tenido características inocuas, sin embargo, se ha registrado la presencia de varios dinoflagelados con potencial tóxico como: *G. catenatum*, *A. catenella*, *A. tamiyavanichi*, *Ceratium dens*, *Dinophysis acumiata*, *Prorocentrum mexicanum*, *P. lima*, *Cochlodinium spp.*, y diatomeas del género *Pseudonitzschia spp.* (Band-Schmitt, 2003), y se ha identificado la presencia de toxinas paralizantes y diarreicas en moluscos bivalvos de la zona (Sierra-Beltrán *et al.*, 1996; Heredia-Tapia *et al.*, 2002). Cortés-Altamirano (1998) define la época de mayor incidencia de mareas rojas de Febrero a Mayo, localizándose en Abril las mareas rojas más tóxicas, particularmente para la costa este del Golfo de California (Sierra Beltrán *et al.*, 1998).

## 2.5 Estado de conocimiento de la respuesta molecular de moluscos bivalvos a la exposición de FAN

Los efectos de las microalgas nocivas en los moluscos bivalvos, así como el de las toxinas y otros metabolitos secundarios que producen, no han sido documentados apropiadamente (Landsberg, 2002; Cortés-Altamirano y Sierra-Beltrán, 2008). Los efectos de neurotoxinas en el comportamiento, sobrevivencia y reproducción de algunas especies es uno de los temas que ha despertado mayor interés de investigación, muy probablemente asociado al efecto de estas toxinas en los humanos que consumen alimentos contaminados (Shumway, 1990; Bricelj y Shumway, 1998; Mons *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2001).

Los moluscos bivalvos que se alimentan de dinoflagelados tóxicos productores de toxinas PSP acumulan las toxinas sin sufrir (aparentemente) sus efectos nocivos en estadio adulto, debido a que la mayoría cuentan con nervios y músculos operados por canales de calcio activados por voltaje (Mons *et al.*, 1998). Se han estudiado los efectos de la exposición de moluscos bivalvos a microalgas tóxicas o productoras de toxinas en condiciones controladas, a diferentes concentraciones microalgales usando modelos de estudio de exposición individualizada de moluscos bivalvos (especie-especie), registrando principalmente respuestas de carácter fisiológico: cierre de valvas, disminución en la tasa de filtración, tasa de crecimiento del bivalvo, formación de pseudoheces y realizando observaciones histológicas de daños en tejidos (Wikfors y Smolowitz, 1995; Wikfors, 2005; Glibert *et al.*, 2007; Hégaret *et al.*, 2007, 2011; Galimany *et al.*, 2008), viabilidad en heces de células ingeridas (Bauder y Cembella, 2000), cinética de depuración de toxinas (Blanco *et al.*, 1997), acumulación de toxinas tejido-específica (en vieiras en músculo aductor se registraron concentraciones menores de toxinas comparado con glándula digestiva, gónada y branquia) (Bricelj y Shumway, 1998), y desarrollo reproductivo anómalo (De las Heras, 2009).

Existen reportes de efectos metabólicos en estadios tempranos de desarrollo de *C. virginica* y *C. ariakensis*, ya que las primeras etapas de vida de estos moluscos pueden ser particularmente susceptibles a los efectos de las FAN a causa de sus tejidos blandos expuestos y a la necesidad de alimento para su desarrollo en larvas maduras a los pocos días de la eclosión (Glibert *et al.*, 2007). Sin embargo, los efectos de las FAN en estadio

embrionario y larval de la mayoría de los moluscos bivalvos son en gran parte desconocidos; estudios recientes sugieren que las FAN pueden afectar el crecimiento y, en algunos casos, el desarrollo y la supervivencia de las larvas. Las FAN tienen el potencial de reducir el crecimiento y la supervivencia de embriones y larvas, lo que a su vez como resultado de un evento disminuirá el reclutamiento (Wikfors y Smolowitz, 1995). Aunque se han realizado estudios toxicológicos de interacción de sustancias tóxicas *in vivo*, los reportes han sido de los efectos ante una combinación de toxinas marinas usando como modelo de estudio a ratones. Por ejemplo, Aasen *et al.* (2011) usando la administración de extracto de yesotoxina de moluscos bivalvos contaminados evaluó el aumento de su toxicidad al combinarse con azaspiracida. Otro estudio se basó en los efectos de una combinación de ácido okadaico y yesotoxina en linfocitos T, células del sistema inmune (Martín-López *et al.*, 2011), así como el análisis de los posibles efectos de una combinación de ácido okadaico y azaspiracida administrada vía oral (Aune *et al.*, 2012).

Durante las últimas 3 décadas ha habido un creciente interés en dilucidar la forma en que se defienden los moluscos de organismos invasores, sin embargo, los estudios se han llevado a cabo principalmente en caracoles de agua dulce y en algunos moluscos bivalvos, siendo muy pocos los estudios fisiológicos en relación a la exposición a dinoflagelados tóxicos y al efecto que estos organismos tóxicos pudieran tener en el sistema de defensa. Los mecanismos de defensa se han evaluado sobre distintos agentes, como protozoos parásitos, levaduras y bacterias (Estrada, 2005). Shumway (1990) ha establecido que existe una relación entre eventos FAN y moluscos bivalvos, describiendo un fenómeno de inmunosupresión con diversas consecuencias, desde una marcada susceptibilidad a los patógenos, hasta una elevada incidencia en neoplasias. Sin embargo, los trabajos enfocados hacia biotoxinas marinas son pocos, enfocándose más a los estudios referentes al efecto de xenobióticos y metales pesados.

Los estudios con toxinas PSP y DSP, basados en respuestas moleculares han sido poco documentados (García-Lagunas, 2011; Romero-Geraldo y Hernández-Saavedra, 2012). Con *P. lima* se ha observado la formación de pseudoheces, patologías en tejidos como el desprendimiento de células intestinales, dilatación de túbulos intestinales, infiltración de hemocitos en manto, gónada y músculo, así como evidencias de respuesta

inmune sistémica al estar en contacto los moluscos bivalvos (De las Heras, 2009; Wikfors, 2005). El sistema inmune de los moluscos está constituido de hemocitos, proteínas plasmáticas y reacciones integradas en sistemas multiméricos que involucran ambos componentes: celular y humoral (Vargas-Albores y Barracco, 2001). Durante la fagocitosis (hemocitos macrófagos) el primer mecanismo de defensa se inicia con la producción de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa) ante el estrés generado por especies reactivas de oxígeno (EROs) y de nitrógeno (ERNs), como fue demostrado por Estrada *et al.* (2007a) al observar una variación en la actividad de estas enzimas en *Nodipecten subnodosus* expuesto a *G. catenatum*; además, estos autores observaron el incremento de la actividad de tripsina,  $\alpha$ -quimotripsina y  $\alpha$ -galactosidasa.

Las EROs actúan como mensajeros secundarios al activar la transcripción de genes específicos para la protección de la célula de los compuestos tóxicos generados por el estrés (Dahlhoff, 2004; Manduzio *et al.*, 2005). Por lo tanto, en esta investigación se trabajó con la premisa de que la expresión de genes de respuesta a estrés y cadena respiratoria se modificará como respuesta de defensa inmediata del ostión ante la exposición aguda a microalgas tóxicas, mientras que a mediano plazo (exposición subcrónica) ocurrirán alteraciones en la expresión de genes involucrados en los procesos metabólicos de la respuesta inmune, citoesqueleto, regulación de ácidos nucleicos, comunicación celular y regulación proteica (Romero-Geraldo y Hernández-Saavedra, 2012).

Con estas bases, el grupo de Genética Molecular del CIBNOR está llevando a cabo trabajos en donde se investiga la tasa de expresión de grupos de genes involucrados en diferentes rutas metabólicas, como consecuencia de la exposición de *C. gigas* a organismos productores de biotoxinas PSP y DSP. Romero-Geraldo (2010), en estudios preliminares en *C. gigas* de 3 a 5 mm evaluó la respuesta de 25 genes específicos (Tabla II) ante una exposición aguda (24 hrs) y subcrónica (14 días) a tres concentraciones celulares de *P. lima*, mediante la técnica de RT-PCR. Antes de caracterizar la expresión, se corroboró el tamaño, identidad y especificidad de los amplicones de la expresión tejido-específico de ostiones adultos bajo condiciones basales. Al caracterizar los niveles de expresión de dichos genes como respuesta de la exposición de *C. gigas* a *P. lima* ( $3 \times 10^2$ ,  $3 \times 10^3$  y  $3 \times 10^4$  cél mL<sup>-1</sup>), se observó un patrón de expresión génica diferencial (regulación positiva o

negativa) en las tres concentraciones probadas del dinoflagelado, así como en relación al tiempo de exposición, respecto a la expresión del gen ribosomal 28S considerado como control.

García-Lagunas (2011), en estudios preliminares con juveniles de *C. gigas* retados con tres concentraciones de *G. catenatum* ( $3 \times 10^2$ ,  $3 \times 10^3$  y  $3 \times 10^4$  cél mL<sup>-1</sup>) observó cierre inmediato de valvas, retracción del manto (no se observaron cilios) y la formación de pseudoheces; de 23 genes analizados, solamente se observaron cambios en la expresión de 16 (Tabla II).

En resumen, en estudios previos realizados por el grupo se probaron 3 concentraciones de dinoflagelados productores de toxinas (PSP y DSP), se observaron cambios fisiológicos y moleculares en ambas situaciones de exposición: en la densidad de  $3 \times 10^2$  cel mL<sup>-1</sup> se observó un efecto metabólico moderado, a  $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> un efecto metabólico severo (sin presentar signos de necrosis), y a  $3 \times 10^4$  cel mL<sup>-1</sup> un efecto metabólico severo con signos de necrosis y mortalidad, especialmente en organismos expuestos a *P. lima*. Se realizaron dos tipos de exposición: aguda (24 h) con un efecto metabólico moderado, y sub-crónica (14 días) con un efecto metabólico severo con signos de necrosis; los efectos fueron especie-dosis- y tiempo-dependientes.

### **2.5.1 *Gymnodinium catenatum***

Se usó la cepa GCCV-6 de *G. catenatum* de la colección de dinoflagelados marinos del CIBNOR (CODIMAR-CIBNOR), que fue aislada de Bahía Concepción, B.C.S., México. *G. catenatum* (Fig. 5) es una especie tóxica, en los florecimientos que forman suele verse en arreglados en cadenas largas, con un promedio de 32 células en una cadena (llegando a ser de 64 células), produciendo una discoloración del agua de color verde-marrón. El tamaño de estas células oscila entre 38-53 µm de largo y 33-45 µm de ancho. Las células son casi circulares, desnudas, con muchos orgánulos redondeados en su interior. Los quistes de *G. catenatum* son de color marrón, esféricos y tienen un tamaño de entre 45-50 µm de diámetro. Esta especie produce toxinas responsables del síndrome PSP (intoxicación parálitica por mariscos) siendo la saxitoxina una de las biotoxinas más peligrosas por su toxicidad ( $80 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  de carne de molusco límite máximo de seguridad



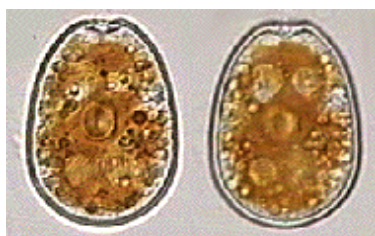
alimentaria), es hidrosoluble y termoestable (FAO, 2005). En México *G. catenatum* se localiza desde el golfo de México hasta las costas del estado de Oaxaca, donde se ha reportado en episodios tóxicos como un evento FAN, con densidades desde 78 a 6600 cel mL<sup>-1</sup> (Cortés-Altamirano, 1998).



**Figura 5.** Organismo reto: *Gymnodinium catenatum* (www.smhi.se).

### 2.5.2 *Prorocentrum lima*

Los eventos FAN de *P. lima* se han reconocido desde 1978 (Murata *et al.*, 1987). Para este trabajo se usó la cepa PRL-1 del dinoflagelado bentónico *P. lima* productor de ácido okadaico (AO) de la colección de dinoflagelados marinos del CIBNOR (CODIMAR-CIBNOR), que fue aislada cerca de la isla El Pardito, en la Bahía de la Paz, Golfo de California. Las células de *P. lima* (Fig. 6) son oblongas a ovales; su tamaño oscila entre los 32-50 µm de largo y los 20-28 de ancho. *P. lima* es productora de las toxinas OA, DTX1, DTX2 causantes de intoxicaciones DSP (intoxicaciones diarreicas por mariscos) a una concentración de 2.041, 1.33 y 0.04 pg cel<sup>-1</sup> respectivamente bajo condiciones estandarizadas de cultivo en laboratorio (Heredia-Tapia *et al.*, 2002; González-Rivera 2009). Se ha reportado normalmente una densidad celular de *P. lima* en el mar de 1 a 2 cel mL<sup>-1</sup>, alcanzando densidades de 30 a 40 cel mL<sup>-1</sup>, sin causar aparentemente efectos nocivos en organismos marinos (Bauder *et al.*, 2001).



**Figura 6.** Organismo reto: *Prorocentrum lima* (www.smhi.se).

## 2.6 Genes de interés en la respuesta de exposición de *C. gigas* a dinoflagelados tóxicos

Los resultados obtenidos a la fecha favorecen la hipótesis general planteada: “compromiso de los aspectos inmunológicos de los moluscos asociados a la interacción con las microalgas utilizadas”, sin embargo, estos resultados se han obtenido en bioensayos exposición individualizada: *C. gigas*-*P. lima* y *C. gigas*-*G. catenatum* (especie-especie). De los 25 genes estudiados (Tabla II), se identificaron aquellos implicados en el metabolismo de *C. gigas* que presentaron mayor regulación (positiva y negativa) en ambas condiciones, seleccionando 5 para la evaluación de la expresión en respuesta a la exposición de *C. gigas* a una combinación de *P. lima* y *G. catenatum*. Los genes seleccionados están involucrados en la síntesis de proteínas de estrés y en la regulación de ácidos nucleicos, que en la Tabla II se denotan sombreados y su función bioquímica se muestra en la Tabla III.

**Tabla II.** Resumen de resultados preliminares en trabajos desarrollados por el Grupo de Genética Molecular del CIBNOR. Se muestra la concentración de microalgas que presentó la mayor regulación en expresión génica ante la exposición individualizada de *C. gigas* a dos especies de dinoflagelados tóxicos.

Grupo de genes	Gen	3,000 cél mL <sup>-1</sup>									
		<sup>a</sup> <i>G. catenatum</i>				<sup>b</sup> <i>P. lima</i>					
		Tiempo de exposición (h)									
		0	3	6	12	24	0	3	6	24	
Proteínas de estrés	Glutamina sintetasa (GS)	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	Glutation-S-transferasa (GST)	-	-	-	+	+	-	X	-	-	-
	Superóxido dismutasa (SOD)										
	Proteína de choque térmico 70 kDa (HSP <sub>70</sub> )						-	-	-	-	-
Cadena respiratoria	Peroxidasa melanogenica (POX)	X	X	+	+	+	X	X	+	X	
	ATP sintasa subunidad b (ATPS)	X	X	+	+	X	-	X	-	X	
	subunidad P2X4 de canal iónico ATP-operado (P2X4)	X	X	+	+	+	+	X	-	X	
	Citocromo oxidasa subunidad I (COI)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Regulación de ácidos nucleicos	Regulador ciclo celular proteína p21 (P21)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Sub. 1 del factor de ensamblaje de la cromatina P <sub>55</sub> (P <sub>55</sub> )	+	+	+	+	-	+	+	-	-	
	Factor elongación 2 (EF2)	-	-	+	+	+	+	+	+	-	
Comunicación celular/respuesta inmune	Immunoelectina-B (ILB)	X	X	X	X	X	√	-	-	X	
	Proteína unión a LPS y β-1,3-glucan (LPS)	√	-	+	+	+	+	+	+	+	
	Lectina hepática (HL)	X	X	X	X	X	-	X	X	X	
Citoesqueleto	β-timosina (THY)	X	X	X	X	X	-	X	X	X	
	Actina, GIA(ACT)	-	-	+	+	+	+	+	+	-	
	actina citoplasmica A3 (ACC)	X	X	X	X	X	+	+	+	-	
Regulación proteica	Tubulina (TUB)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Lisozima (LIZ)	X	X	X	X	X	X	-	-	X	
	Tripsina (TRY)	+	-	+	+	+	X	X	X	X	
Metabolismo energético	Ser (or Cys) inhibidor de proteinasa (PRTI)	X	X	X	X	X	+	+	+	X	
	Fosfatasa alcalina (ALK)	X	X	X	X	X	X	-	+	X	
Constitutivo	Gluconasa β 1-3 (GLN)	X	X	X	X	X	X	-	+	X	
	28S ribosomal	+	+	+	+	-	+	+	+	+	

Código: (-) disminución de la expresión, (+) incremento de la expresión, (√) sin cambio, respecto al control, (x) no se observó expresión (<sup>a</sup> García-Lagunas, 2011; <sup>b</sup> Romero-Geraldo, 2010)

**Tabla III.** Genes de interés y su función bioquímica (Mathews, 2003; Álvarez, 2009; Romero-Geraldo, 2010).

GEN	FUNCIÓN BIOQUÍMICA.
Glutamina sintetasa	Es una enzima esencial en el metabolismo del nitrógeno, catalizando la reacción química de glutamato y amonio para formar glutamina: <b>Glutamato + ATP + NH<sub>3</sub> → Glutamina + ADP + fosfato + H<sub>2</sub>O</b> . La glutamina es una de las pocas moléculas de aminoácido que posee dos átomos de nitrógeno (normalmente solo poseen un átomo de N). Esta característica le convierte en una molécula ideal para proporcionar nitrógeno a las actividades metabólicas del cuerpo. Su biosíntesis en el cuerpo ayuda a 'limpiar' de amoníaco algunos tejidos (tóxicos en algunas concentraciones).
HSP <sub>70</sub>	Las proteínas de shock térmico de 70 KDa o HSP <sub>70</sub> son proteínas que están implicadas en el plegamiento de proteínas y, por tanto, en su estructura. Son necesarias para el correcto desarrollo de la fisiología celular, además, son especialmente abundantes en respuesta a estrés térmico y de otros tipos. Su función es de chaperona molecular, estabilizando proteínas en estado de plegamiento parcial, como por ejemplo durante el transporte de membrana; la unión temporal de estas chaperoninas a los residuos hidrofóbicos impide la agregación y facilita el plegamiento. Los genes que codifican a proteínas de esta familia se sobreexpresan bajo condiciones de estrés térmico o en presencia de tóxicos como el arsénico, cadmio, mercurio, cobre.
Cu/Zn SOD	La enzima superóxido dismutasa (SOD) es una importante defensa antioxidante en la mayoría de las células expuestas a oxígeno. Protege a la célula de las reacciones dañinas del radical superóxido; la SOD dismuta al radical superóxido a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno.
Glutatión-S-transferasa	Son una familia de enzimas destoxicantes, que catalizan la conjugación de glutatión reducido (a través del grupo sulfhidrilo) a centros electrofílicos en una amplia variedad de sustratos. Desintoxica compuestos como lípidos peroxidados y también puede enlazar toxinas y funcionar como transportador de proteínas.
Sub. 1 del factor de ensamblaje de la cromatina P <sub>55</sub>	Proteína que actúa en la acetilación de histonas (histona-acetiltransferasa, HAT) también relacionada con regulación de la transcripción a través de la regulación de diferentes procesos celulares, ensamblaje y maduración de la cromatina.
28S ribosomal	Subunidad del ARN ribosomal 28S. CONTROL.

### 3. Justificación

Los estudios moleculares de expresión génica de *C. gigas* en respuesta a la exposición a dinoflagelados tóxicos son escasos. En el grupo de Genética Molecular del CIBNOR se investigan los cambios en los patrones y tasas de expresión de grupos de genes involucrados en diferentes rutas metabólicas, como consecuencia de la exposición de *C. gigas* a organismos productores de biotoxinas marinas del tipo PSP y DSP. Los resultados obtenidos a la fecha, favorecen la hipótesis general planteada: “compromiso de los aspectos inmunológicos de los moluscos asociados a la interacción con las microalgas utilizadas”, estos resultados se han obtenido en bioensayos de exposición independiente a las dos especies de dinoflagelados productores de toxinas marinas seleccionadas para el estudio: *P. lima* (PRL-1) y *G. catenatum* (GCCV-6), siendo estas especies las que han predominado en los eventos FAN de los que se tiene registro en las costas del pacífico mexicano. El presente estudio forma parte de un proyecto que pretende asociar los cambios en la expresión de un grupo clave de genes como posibles causas de la inmunodepresión del sistema de defensa natural del ostión japonés, que tiene como consecuencia altas mortandades de ostión ubicando los puntos críticos durante su cultivo. En este trabajo, se generó información básica que permitirá identificar algunas rutas metabólicas que son susceptibles a la presencia de los organismos FAN mediante el monitoreo de la expresión de genes específicos.

La mayoría de los trabajos publicados se han basado en diseños experimentales donde se expone (en condiciones controladas) a los organismos de estudio a diferentes concentraciones microalgales de manera especie-especie, sin existir hasta el momento estudios donde se usen modelos complejos de exposición, ya que los sistemas de floraciones algales nocivas han sido descritos como ecosistemas en sí, presentan una estructura propia coherente. Estos ecosistemas (HABs) muestran una variabilidad importante a varias escalas de espacio y tiempo, ya que se observa el sucesivo reemplazo y coexistencia de las distintas especies de microalgas (tóxicas o no), donde éstas imponen sus estrategias reproductivas evidenciándose en términos de biomasa. En este trabajo de investigación se realizó un diseño experimental que trata de emular de forma simplificada el fenómeno de sucesión de especies en el ambiente marino, construyendo así un modelo

complejo de exposición. Generalmente los seres vivos en su ambiente natural están bajo constante peligro de agentes bióticos tales como organismos patógenos y metabolitos secundarios derivados de estos, ó agentes abióticos como los de origen antropogénico, y estos pueden estar presente en diferente número, por lo que los organismos están expuestos a más de uno a la vez. A menudo, las combinaciones de sustancias tóxicas originan efectos diferentes de los que se hubiera predicho para las mismas sustancias de manera independiente. Esta compleja área de estudio constituye el tema central de diversas investigaciones toxicológicas desarrolladas en la actualidad (Capo, 2007). Lamentablemente, se desconoce la naturaleza de muchas interacciones, tal es el caso del nulo conocimiento de los efectos de la exposición de *C. gigas* a una combinación de organismos productores de toxinas marinas PSP+DSP, en la cual se consideró las posibles interacciones fisicoquímicas, describiéndose a continuación los principales (Vásquez, 2005; Repetto, 2009):

- **Efecto aditivo:** en este caso, el efecto combinado de dos agentes químicos es la suma de efecto de cada uno de ellos cuando se administran de forma independiente.
- **Efecto sinérgico:** en este caso, el efecto combinado de dos agentes químicos es mucho mayor que el efecto de la suma de los dos.
- **Antagonismo:** en este caso, se refiere a la exposición a dos agentes químicos que son administrados de una manera simultánea o consecutiva, de los cuales uno de ellos interfiere con la acción del otro.

#### **4. Hipótesis**

Si la exposición individual de *C. gigas* a organismos productores de toxinas PSP y DSP tiene efectos en la expresión de genes involucrados en diversas rutas metabólicas, entonces, la exposición combinada a organismos productores de toxinas paralizantes y diarreicas (PSP y DSP), provocará efectos aditivos y/o sinérgicos y/o antagónicos en la respuesta observada de forma independiente en el ostión.

#### **5. Objetivos**

##### **5.1 Objetivo general**

Determinar el efecto de la exposición de *C. gigas* a una combinación de organismos productores de toxinas marinas, PSP y DSP, en la tasa de expresión de genes clave relacionados con el metabolismo.

##### **5.2 Objetivos específicos**

1. Determinar la respuesta en la alimentación y la mortalidad en juveniles de *C. gigas* expuestos a una combinación de *G. catenatum* (PSP) y *P. lima* (DSP).
2. Determinar el efecto combinado de dinoflagelados tóxicos (PSP + DSP) en la tasa de expresión de genes que codifican proteínas de respuesta generalizada a estrés y de regulación de ácidos nucleicos en juveniles de *C. gigas* mediante RT-PCR.
3. Determinar el efecto combinado de dinoflagelados tóxicos (PSP + DSP) la tasa de expresión de genes que codifican proteínas de respuesta generalizada a estrés y de regulación de ácidos nucleicos en juveniles de *C. gigas* mediante PCR en tiempo real (qPCR).

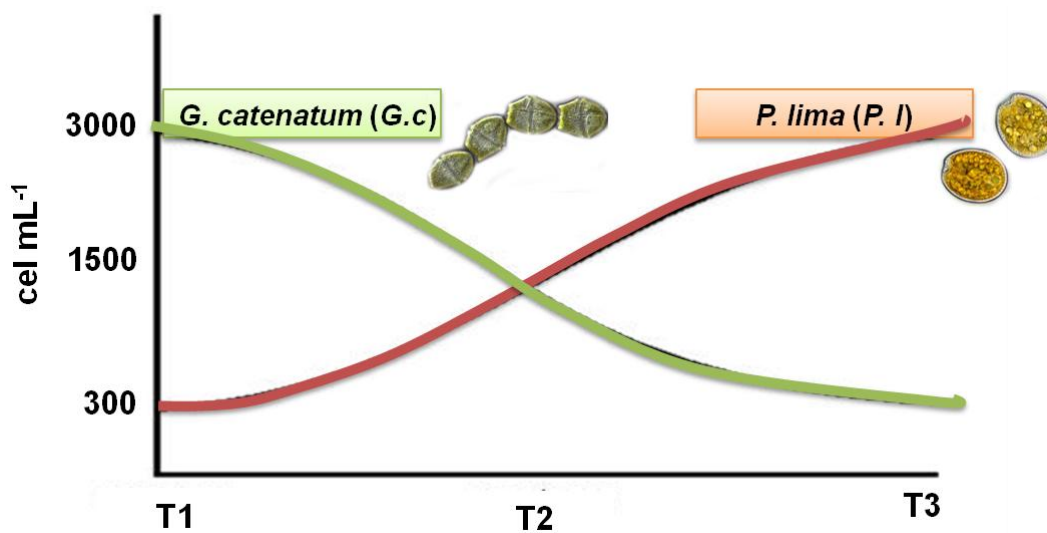
## 6. Materiales y métodos

### 6.1 Planteamiento de la investigación

Se usaron concentraciones de combinación de dinoflagelados tóxicos que no presentaron signos de efecto severo como necrosis y mortalidad (García-Lagunas, 2011; Romero-Geraldo, 2010) con el fin de un seguimiento completo de los perfiles de expresión génica:

1. Tratamiento 1:  $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> de *G. catenatum* +  $3 \times 10^2$  cel mL<sup>-1</sup> de *P. lima*.
2. Tratamiento 2:  $1.5 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> de *G. catenatum* +  $1.5 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> de *P. lima*.
3. Tratamiento 3:  $3 \times 10^2$  cel mL<sup>-1</sup> de *G. catenatum* +  $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> de *P. lima*.

emulando tres puntos equidistantes durante el desarrollo de un evento FAN representando el fenómeno de sucesión de especies (Fig. 7), construyendo con esto, un sistema complejo de exposición. Con este diseño experimental fue posible contrastar los datos de expresión obtenidos en los bioensayos de exposición individualizada con los obtenidos en este trabajo, con la finalidad de evaluar el efecto ante una combinación de organismos productores de biotoxinas marinas de diferente naturaleza química y distintos mecanismo de acción.



**Figura 7.** Representación esquemática del sistema de exposición simulando de manera simplificada la dinámica del hábitat natural de *C. gigas* durante un evento de FAN.



## 6.2 Juveniles de *C. gigas*

Para el monitoreo de la expresión de genes específicos mediante RT-PCR y PCR en tiempo real (qPCR), se obtuvieron juveniles de 5 - 6 mm de *C. gigas* del laboratorio de producción de semilla de ostión “Acuacultura Robles SPR de RI” (Las Botellas, BCS).

## 6.3 Microalgas

Para el desarrollo de este trabajo se cultivaron dos especies de dinoflagelados tóxicos:

- *G. catenatum* cepa GCCV-6 depositada en la CODIMAR (CIBNOR), que fue aislada de Bahía Concepción, B.C.S., México.
- *P. lima* cepa PRL-1 depositada en el Cepario (CIBNOR); esta cepa fue aislada cerca de la isla El Pardito, en la Bahía de la Paz, Golfo de California.

Se usó *Isochrysis galbana* (Laboratorio de Alimento Vivo, CIBNOR) como dieta no tóxica para el grupo control del experimento. Esta microalga es ampliamente usada como alimento para el cultivo en suspensión de moluscos bivalvos por ser fácilmente digerible por su pequeño tamaño y ausencia de pared celular (Wikfors y Patterson, 1994).

## 6.4 Cultivo de dinoflagelados

Las microalgas se cultivaron en medio f/2 + Se (Guillard y Ryther, 1975) bajo los siguientes parámetros (López-Cuevas, 2009; García-Lagunas, 2011):

T = 24 °C

t = hasta alcanzar  $1 \times 10^4$  cel mL<sup>-1</sup> o antes de la fase de muerte exponencial (para ambas especies a los 18 días de cultivo).

Iluminación = 24 horas de luz

Irradiación de luz = 21-22  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}$

## 6.5 Diseño experimental

### 6.5.1 Bioensayo de juveniles de 5-6 mm de *C. gigas*

Para la obtención del perfil de expresión de exposición aguda (24 horas) y sub-crónica (10 días) se usaron juveniles de *C. gigas* de entre 5-6 mm (Fig. 8). Los organismos se colocaron en 15 unidades experimentales, tres unidades (réplicas) para cada tratamiento, que consistieron en: control (C1), *C. gigas* sin alimento; control 2 (C2), *C. gigas* alimentados con: *I. galbana* (*Ig*) ( $3.0 \times 10^5$  cel mL<sup>-1</sup>), y tres tratamientos con una combinación de especies de organismos productores de toxinas: *P. lima* (*P.l*) y *G. catenatum* (*G.c*). Se probaron tres concentraciones de combinaciones de microalgas tóxicas para los tratamientos T1, T2, T3 (ver punto 6.1), así como 3 réplicas para cada tratamiento (R1, R2, R3). A la par del bioensayo se prepararon un número igual de unidades experimentales en las que se mantuvieron organismos de recambio con la finalidad de mantener la misma tasa de aclaramiento y respiración que en las unidades del bioensayo (en las que se llevó a cabo el muestreo). El bioensayo se realizó de acuerdo con la matriz de trabajo mostrada en la Tabla IV. Se realizaron cinco muestreos para determinar el efecto agudo: al tiempo cero, y a las 3, 6, 12 y 24 horas de exposición, y cinco muestreos correspondientes al bioensayo de exposición sub-crónica a los cero, 3, 5, 7 y 10 días. En cada unidad experimental (frasco de vidrio de boca ancha de 100 mL previamente lavado y esterilizado) se colocaron 50 juveniles de *C. gigas*, en un volumen de trabajo de 50 mL. En cada muestreo se colectaron 5 organismos de cada réplica de cada tratamiento en cada tiempo. Los organismos colectados se enjuagaron con agua de mar filtrada estéril, y estas muestras se conservaron a -80°C hasta su posterior procesamiento.

Con las muestras tomadas se hicieron muestras homogéneas para la extracción de ARN total (3 mezclas de 5 organismos, cada uno por tiempo de muestreo), que se utilizaron para las determinaciones de los niveles de expresión de los genes en estudio.

Los bioensayos se llevaron a cabo en el Laboratorio Húmedo de Seguridad Biológica (LHSB, CIBNOR) con acceso restringido y condiciones de temperatura e iluminación controladas (20 °C  $\pm$ 1 °C; ciclos 12/12 luz-oscuridad). En el caso de la

exposición sub-crónica, se realizaron recambios del 100% cada 24 horas, suministrando diariamente la dosis de dinoflagelados correspondiente a cada tratamiento.

**Tabla IV.** Matriz experimental para exposición aguda y sub-crónica de juveniles de *C. gigas* a organismos productores de toxinas DSP y PSP.

Unidad de recambio	Unidad de muestreo	cel mL <sup>-1</sup>	Réplica (# org.)	Tiempo de muestreo (horas)					Tiempo de muestreo (días)				
				0	3	6	12	24	3	5	7	10	
C'1	C1	Sin alimento.	1 (50)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
			2 (50)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
			3 (50)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
C'2	C2	<i>Ig</i> 3 x 10 <sup>4</sup>	1 (50)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
			2 (50)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
			3 (50)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
T'1	T1	<i>G.c</i> 3x10 <sup>3</sup> <i>P.l</i> 3 x 10 <sup>2</sup>	1 (50)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
			2 (50)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
			3 (50)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
T'2	T2	<i>G.c</i> 1.5x10 <sup>3</sup> <i>P.l</i> 1.5x10 <sup>3</sup>	1 (50)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
			2 (50)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
			3 (50)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
T'3	T3	<i>G.c</i> 3x10 <sup>2</sup> <i>P.l</i> 3x10 <sup>3</sup>	1 (50)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
			2 (50)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
			3 (50)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5



**Figura 8.** Lote de juveniles de *C. gigas* del que se seleccionaron los organismos para el bioensayo (talla de 5-6 mm).

## 6.6 Laboratorio Húmedo de Seguridad Biológica

El Laboratorio Húmedo de Seguridad Biológica (LHSB), ubicado en la zona posterior el Edificio B, forma parte de la infraestructura física del Programa de Ecología Pesquera del CIBNOR, dentro de la Línea Estratégica EP 3.0 “Variabilidad y Vulnerabilidad de Ecosistemas Pesqueros en el Noroeste de México”. Esta instalación cuenta con infraestructura apropiada para aclimatar y acondicionar organismos marinos que puedan ser mantenidos en contenedores de volumen reducido (menos de 70 litros) y, principalmente, retarlos con la presencia de sustancias tóxicas, nocivas y/o patógenas, evaluando las respuestas de los organismos marinos ante retos ambientales en la forma de sustancias tóxicas o patógenos, es una instalación de uso exclusivo y acceso restringido. Esto debido a las precauciones necesarias para el control de los ingresos como egresos de animales, sustancias, efluentes y demás materiales de trabajo necesarios para el buen desempeño de las instalaciones y que se pueda cumplir con el fin de no permitir el ingreso no deseado, escape o fuga de ningún compuesto u organismo tóxico, nocivo o abiertamente patógeno fuera de las mismas. Los experimentos se realizarán en todo momento mediante una apropiada planeación y sometiéndose a un reglamento de la instalación, así como a los lineamientos y procedimientos internos del CIBNOR (Sierra-Beltrán, 2010).

## 6.7 Filtración de dinoflagelados por *C. gigas*

Para cada unidad experimental, el cálculo de la tasa de filtración se realizó mediante el conteo directo las microalgas en cámara Sedgwick-Rafter, con un microscopio óptico (Lobban *et al.*, 1988). El volumen total de la cámara es de 1 mL, por lo que los resultados se expresan como cel mL<sup>-1</sup>. Las muestras se fijaron con 20 µL de una solución de Lugol (Escobedo-Lozano *et al.*, 2012) y se tomaron desde el inicio del bioensayo (cero horas) y a las 3, 6, 12, 24 h, durante los diez días de experimentación.

## **6.8 Extracción y procesamiento del ARN total**

### **6.8.1 Aislamiento de ARN**

Para el aislamiento del ARN de las muestras colectadas durante el bioensayo se implementó el método del tiocianato de guanidina ácido-fenol cloroformo (solución AGPC) (Chomczynski y Sacchi, 1987). Para la obtención del ácido nucleico se trabajó en un entorno libre de ARNasas, al tratar con DEPC al 0,1% todas las soluciones utilizadas (Sambrook *et al.*, 1989) y manteniendo en baño de hielo las muestras para evitar la degradación del ARN.

Brevemente, el protocolo usado consistió en: al conjunto de 5 organismos (juveniles de *C. gigas*) se le agregaron 500  $\mu\text{L}$  de solución AGPC y se homogeneizó con un pistilo de vidrio en un tubo Eppendorf de 1.6 mL Después se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio 2M (mezclando por inversión), 500  $\mu\text{L}$  de fenol saturado en agua DEPC (mezclando por inversión) y 150  $\mu\text{L}$  de cloroformo (mezclando por inversión). Los tubos se incubaron 15 min a 4 °C y se centrifugaron a 11,000  $\times g$ , 20 min. a 4 °C. Se colectaron 500  $\mu\text{L}$  de la fase acuosa que se colocaron en un tubo nuevo y el ARN se precipitó agregando 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol frío (100%), incubándose 20 min a -20°C. Para recuperar el ARN las preparaciones se centrifugaron a 11,000  $\times g$  20 min a 4°C, descartando el sobrenadante. Se realizó una segunda extracción al resuspender el pellet de ARN en 500  $\mu\text{L}$  de solución AGPC. Posteriormente, se realizaron 2 lavados del precipitado de ARN con 500  $\mu\text{L}$  etanol frío (75 %) mezclando por inversión y centrifugando a 10,000  $\times g$ , 20 min. a 4°C. Finalmente, el pellet de ARN se secó a temperatura ambiente y se re suspendió en 40  $\mu\text{L}$  de agua DEPC.

### **6.8.2 Cuantificación y análisis de integridad del ARN**

La concentración de ácidos nucleicos en las muestras se realizó midiendo la absorbancia a 260 nm en espectrofotómetro (NanoDrop ND-2000®, Thermo Scientific), con la consideración de que una Unidad de absorbancia a 260 nm es igual a 40  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (ARN -hebra simple-). Para verificar la pureza del ARN, las muestras se analizaron determinando la relación 260/280, así como un análisis en gel de agarosa/Synergel® al 1%

en buffer TBE-DEPC, para verificar su integridad. La ausencia de ADN genómico en las muestras de ADN se verificó mediante PCR convencional, tomando 1  $\mu\text{L}$  del material genético obtenido (sin diluir) que se usó como templado para una reacción con cebadores universales del gen 28S ribosomal. Se usó ADN genómico de *C. gigas* como control positivo y como control negativo una reacción sin templado. Los productos de la reacción de amplificación se analizaron mediante electroforesis en sistema submarino (BioRad) en geles de agarosa/Synergel<sup>®</sup> al 1% en buffer TBE; las imágenes se documentaron en formato digital usando un fotodocumentador (UVITEC, UVP Inc. <sup>®</sup>, England).

### **6.9 Síntesis de ADNc**

Para la síntesis del ADNc se utilizó el Kit ImProm-II<sup>™</sup> Reverse Transcriptase (Promega). Brevemente, se tomó 1  $\mu\text{g}$  de ARN libre de ADNasa (en un volumen final de 4  $\mu\text{L}$ ) y se agregó 1  $\mu\text{L}$  de oligo-dT20 (0.50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), incubándose a 65°C durante 5 min. Los tubos se enfriaron en hielo y se agregaron 6.1  $\mu\text{L}$  de agua miliQ, 4  $\mu\text{L}$  de Improm-II 5X buffer (Promega), 2.4  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25 mM), 1  $\mu\text{L}$  de dNTPs (0.5 mM) y finalmente 1  $\mu\text{L}$  de Improm-II RT (Promega). Las reacciones se incubaron 5 min a 25 °C, 60 min a 50 °C, y finalmente, 15 min a 70 °C; posteriormente las reacciones se almacenaron a -20°C hasta su uso.

### **6.10 Extracción de ADN**

Se extrajo ADN de musculo de ostión japonés adulto para la amplificación de fragmentos de los genes de interés y usar estos productos como templado para las reacciones usadas en la construcción de las curvas estándar de cuantificación usadas en el análisis de expresión mediante qPCR. Se tomaron secciones de tejido de musculo aductor de 15 mg (por triplicado) y se colocaron en tubos Eppendorf de 1.7 mL, se agregó 1 mL de buffer de extracción (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 100 mM EDTA, pH 8.0; 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ARNasa pancreática -Qiagen-; 0.5% SDS), y las muestras se homogenizaron con pistilo, incubándose a 37°C por una hora. Posteriormente, se agregaron 20  $\mu\text{L}$  de proteinasa K (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Sigma-Aldrich) y las muestras se incubaron a 50°C por 3 horas, con agitación intermitente cada 30 min. A las 1.5 horas de incubación se agregaron a cada muestra 20  $\mu\text{L}$

adicionales de proteinasa K. La suspensión celular de cada tubo se dividió en dos partes iguales que se transfirieron a otros tubos Eppendorf de 1.6 mL, a cada tubo se le agregó un volumen de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamilico (25:24:1), los tubos se agitaron por inversión y se dejaron en reposo por 10 min a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a  $5000 \times g$  por 15 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo y se le adicionaron 0.2 volúmenes de acetato de sodio 3M y 2 volúmenes de etanol absoluto pre-enfriado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (para precipitar el ADN). Las muestras se mantuvieron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 min y posteriormente se centrifugaron a  $15\ 000 \times g$  por 15 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se desechó cuidadosamente el sobrenadante. El pellet se secó al aire por 15 min y posteriormente se disolvió en  $200\ \mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas. La cuantificación del ADN se realizó mediante espectrofotometría (NanoDrop ND-2000®, Thermo Scientific), se calculó la relación 260/280, se revisó la integridad del ADN en geles de agarosa/Synergel® al 1% pre teñidos con bromuro de etidio en buffer TAE, tomando  $4\ \mu\text{L}$  de muestra y  $2\ \mu\text{L}$  de buffer de carga. La electroforesis se corrió a 80 V por 45 min; las imágenes se documentaron en formato digital usando un foto documentador (UVITEC, UVP Inc. ®, England) bajo siguientes condiciones: foco 4, aumento 25X y brillo .400.

### **6.11 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) análisis semicuantitativo de genes involucrados en diferentes rutas metabólicas (RT-PCR)**

Los ADNc sintetizados a partir de las muestras de ARN se utilizaron como templado para la amplificación de fragmentos específicos de los genes enlistados en las Tablas V y VI. Las mezclas de reacción para el PCR consistieron de lo siguiente: en un tubo Eppendorf de  $200\ \mu\text{L}$  se colocaron  $2\ \mu\text{L}$  de ADNc ( $80\ \text{ng}\ \mu\text{L}^{-1}$ ) y  $1\ \mu\text{L}$  de una mezcla de cebadores F-R ( $10\ \text{pmol}$ ) específicos para cada gen (Tablas V y VI). En otro tubo se preparó el mix de reacción para el total de muestras a analizar, el cual contenía por reacción:  $0.25\ \mu\text{L}$  de dNTPs ( $10\ \text{mM}$ ),  $1.25\ \mu\text{L}$  de 10X buffer (Tris-HCl  $100\ \text{mM}$  pH 8.3, KCl  $500\ \text{mM}$ ) (Qiagen),  $0.375\ \mu\text{L}$  de  $\text{MgSO}_4$ ,  $0.07\ \mu\text{L}$  de Taq polimerasa ( $5\ \text{U}\ \mu\text{L}^{-1}$ ) (Invitrogen®) y  $7.5\ \mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  miliQ. La mezcla se homogenizó con micropipeta y se agregaron  $9.5\ \mu\text{L}$  de la mezcla de reacción a cada tubo que contenía el ADNc y los oligonucleótidos para completar un volumen final de reacción de  $12.5\ \mu\text{L}$ . Las reacciones

se llevaron a cabo en un termociclador (Corvette Palm Thermal cycler) bajo los siguientes parámetros: 95°C 60 seg, 40 ciclos de 94°C 1 min; 45°C 1 min y 72°C 1 min, con una extensión final de 72°C 10 min. Antes de colocarse en el termociclador a los tubos preparados se les dio un pulso en centrifuga (para reunir en el fondo todas los componentes de la reacción).

**Tabla V** Grupo de genes relacionados con la síntesis de proteínas de estrés evaluado mediante RT-PCR.

	<b>Gen</b>	<b>Secuencia de nucleótidos*</b>	<b>Pb</b>	<b>Número de acceso</b>
<b>Proteínas de estrés</b>	Glutamina sintetasa (GS)	F 5'-GACACTGGACTTTTGAA C -3' R 3'-GCCTCAACTATGTCCC-5'	402	AJ558239
	Glutación-S-transferasa (GST)	F 5'-TGGACCAGGTGTATCC-3' R 3'-GAATACGTTCAAACCATG-5'	272	CB617406
	HSP <sub>70</sub> (HSP <sub>70</sub> )	F 5'-GCAAGCCATTGGAATAG-3' R 3'-GGACCATGGATGAGAC-5'	480	AJ305315
	Superóxido dismutasa (SOD)	F 5'-GTAAATTTTCGCGCCGG-3' R 3'-GTGGACCGAGTGGAG-5'	542	AJ496219
<b>Regulación de ácidos nucleicos</b>	Sub. 1 del factor de ensamblaje de la cromatina P55 (P55)	F 5'-TTCAGACACAGAGCAGA-3' R 3'-TCGTGGAAGATGTGGC-5'	500	CB617555

Nota (\*): tomado de Romero-Geraldo y Hernández-Saavedra, 2012.

**Tabla VI.** Gen evaluado para el control de expresión.

<b>Gen</b>	<b>Secuencia de nucleótidos*</b>	<b>Pb</b>	<b>Número de acceso</b>
<b>28s ribosomal</b>	F 5'-GCAGGAAAAGAACTAAC-3' R 3'-CCTCTAAGTGGTTTCAC-5'	300	AY632555

Nota (\*): tomado de Romero-Geraldo y Hernández-Saavedra (2012).

Los amplicones obtenidos se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa/Synergel<sup>®</sup> al 1% en buffer TBE 1X pre-teñidos con bromuro de etidio. En cada pozo se cargaron 10 µL de cada producto y 2 µL de buffer LB (azul de bromofenol y glicerina), colocando en cada gel un carril con marcador de 1 Kb (Invitrogen). Las



electroforesis se desarrollaron en cámaras submarinas horizontales (BioRad) a 80 V por 80 min. Los geles se documentaron digitalmente con un fotodocumentador (UVITEC, UVP Inc. ®, England) bajo las siguientes condiciones: foco 4, aumento 25X y brillo 0.400. La intensidad de las bandas en los geles se analizó mediante análisis densitométrico con el software UVIDOC V.97, para obtener datos numéricos y realizar la estimación semi cuantitativa de la tasa de expresión de cada uno de los genes analizados.

## **6.12 Análisis de expresión cuantitativa de genes relacionados con distintas rutas metabólicas**

### **6.12.1 Estandarización de qPCR**

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real se usa para amplificar y al mismo tiempo cuantificar moléculas de ADN o ADNc específicas, y con ello la obtención de datos fiables y precisos sobre la expresión genética en células o tejidos en estudio. Con el uso de oligonucleótidos diseñados en el grupo de Genética Molecular (Romero-Geraldo y García-Lagunas, en proceso) se estandarizó la técnica de qPCR construyendo las distintas curvas estándar tanto para cuantificación de los genes de interés como para el gen de referencia utilizado (28S ribosomal).

Para la construcción de las curvas estándar, se realizaron reacciones de PCR usando como templado ADN genómico (punto 6.10) usando los cebadores específicos para cada gen (Tablas VI y VII). Con los amplicones obtenidos se prepararon las diluciones seriales 1:10 para su análisis en PCR de tiempo real. La reacción de PCR punto final se realizó en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$  empleando una esfera de *illustra*<sup>TM</sup> pureTaq ready-to-go PCR Beads (GE Healthcare), 22  $\mu\text{L}$  de agua, 1  $\mu\text{L}$  de cada cebador (10  $\mu\text{M}$ ) y 1  $\mu\text{L}$  de ADN genómico (50 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador (Techne Genius Thermal Cycler) bajo los siguientes parámetros: desnaturalización inicial de 95°C 5 min; y 40 ciclos de 95 °C 5 s; 64 °C 60 s. y 75 °C 10 s. Los productos se verificaron en geles de agarosa 3 % preteñido con bromuro de etidio, tomando 4  $\mu\text{L}$  de cada producto. El producto restante se purificó mediante el uso del kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) conforme las indicaciones del fabricante. Posteriormente, se

realizó una cuantificación mediante espectrofotometría (NanoDrop ND-2000®, Thermo Scientific).

Una vez que se obtuvo la amplificación específica de cada uno de los genes a analizar, se determinó la eficiencia de reacción de amplificación (E) para cada gen de acuerdo al siguiente protocolo, brevemente: se usó un volumen final de 15  $\mu\text{L}$  empleando 7.5  $\mu\text{L}$  de iQ<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Inc.), 5.5  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas, 0.5  $\mu\text{L}$  de cada cebador (5  $\mu\text{M}$ ) y 1  $\mu\text{L}$  de templado (diluciones 1<sup>-1</sup> hasta 10<sup>-8</sup> en agua destilada libre de nucleasas partiendo de una concentración inicial de 100 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ). Cada dilución se ensayó por triplicado y se corrieron reacciones como controles negativos sin ADN (NTC) y controles con ADN en concentración de 0.5 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  como control positivo. Las reacciones de PCR en tiempo real se llevaron a cabo en un Termociclador rotor gene 3000 (Corbett Research) bajo el siguiente programa: 95°C 5 min; 40 ciclos de 95°C 5 s, 64°C 60 s y 75°C 10 s. Al término del programa se determinó la curva de disociación de cada producto en un incremento de 0.3°C s<sup>-1</sup> de 65°C a 95°C para discriminar la formación de productos inespecíficos (tales como dímeros) de cada par de cebadores en las posteriores reacciones de PCR. Se fijó la eficiencia de amplificación a un valor mayor de 95%.

### **6.12.2 Análisis de expresión cuantitativo de genes de proteínas de estrés**

Para el análisis cuantitativo de expresión de los genes, la mezcla de reacción contenía 7.5  $\mu\text{L}$  de iQ<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Inc.) 4  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas, 0.5  $\mu\text{L}$  de cada cebador (5  $\mu\text{M}$ ) y 2.5  $\mu\text{L}$  de ADNc (80 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ), en un volumen final de 15  $\mu\text{L}$ . Para el análisis de las muestras se realizó una mezcla de las replicas de cada tratamiento en su tiempo de muestreo, y se analizaron por triplicado; en cada corrida de amplificación se incluyeron un control negativo (sin ADN, NTC) y un control positivo (con ADN en concentración de 0.5 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ). Se usó como método de análisis de datos el  $2^{-\Delta\Delta\text{Cq}}$  (Livak y Schmittgen, 2001). Brevemente, el método usa una fórmula aritmética para obtener la cuantificación, donde, Cq es el número del ciclo umbral y  $\Delta\Delta\text{Cq} = [\text{Cq muestra patrón (desconocida)} - \text{Cq referencia (desconocida)}] - [\text{Cq muestra patrón (calibrador)} - \text{Cq referencia (calibrador)}]$ . El gen 28S fue utilizado como gen de

referencia, pues ha sido utilizado por el grupo de Genética Molecular con los mismos modelos biológicos con excelentes resultados (Romero-Geraldo, en proceso, García-Lagunas, en proceso). Por otra como calibrador se usaron muestras en las que representaron la unidad de cambio de la expresión para comparación. El cálculo de  $\Delta\Delta Cq$  se realizó tras comprobar que la reacción tuvo una eficiencia del 100% y que cada gen que se comparó tenía la misma pendiente. Para la cuantificación precisa de la cantidad de ADNc de cada muestra (usando el algoritmo del sistema de detección) se fijaron tres parámetros: la línea base, el umbral y el ciclo umbral (Cq o ciclo de la PCR a partir del cual se produce dicho umbral).

### **6.13 Análisis estadísticos**

El análisis estadístico se realizó con el programa STATISTICS V9. Se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar la normalidad de la distribución de datos, se verificó la homogeneidad de varianza mediante el test de Levene (Brown y Forsythe, 1974) y se efectuó la prueba ANOVA de dos vías (factorial) (Spiegel *et al.*, 2007) para determinar si hubo diferencias significativas entre el efecto de los tratamientos y el control, y el efecto de la interacción de tiempo-tratamiento. También se aplicó una prueba a posteriori (Tukey) para identificar los grupos en los que se presentaron las diferencias significativas (Tabla VII); se estableció una significancia estadística  $p < 0.05$ .

Se analizó la variación en la expresión del gen constitutivo 28S a través de la duración del bioensayo (240 h), como los resultados mostraron mínima variación de la expresión de este gen, se utilizó como gen de referencia en qPCR y como control de expresión en los análisis de RT-PCR. Para el análisis y representación gráfica de los resultados, la expresión de los grupos control se consideró como cero (0.0), por lo que las variaciones con respecto a eje fijado fueron consideradas como sobreexpresión (valores encima de 0) y represión (valores debajo de 0); los datos de expresión se expresaron en Unidades Arbitrarias de Expresión. Para la construcción y visualización de datos en gráficos, se calcularon los promedios y las desviaciones estándar de las réplicas de cada tratamiento.

**Tabla VII.** Resumen de planteamiento de hipótesis del análisis estadístico.

<b>Hipótesis del análisis estadístico:</b>	
$H_0$ (T):	$\mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_J$ Las $J$ medias poblacionales correspondientes a los $J$ niveles del factor <b>Tratamiento</b> son iguales. (factor T no influye) no hay diferencia significativas entre las medias estadísticas de los tratamientos y el control
$H_0$ (t):	$\mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_K$ Las $K$ medias poblacionales correspondientes a los $K$ niveles del factor <b>tiempo</b> son iguales.
$H_0$ (AB):	$\mu_{jk} - \mu_{j'k} = \mu_{j-} - \mu_{j'}$ No hay efecto de interacción entre ambos factores.
$H_1$ (t):	$\mu_j \neq \mu_{j'}$ El factor tiempo (t) influye o afecta a la variable dependiente (VD).
$H_1$ (T):	$\mu_k \neq \mu_{k'}$ El factor tratamiento (T) influye o afecta a la VD.
$H_1$ (AB):	$\mu_{jk} - \mu_{j'k} \neq \mu_{j-} - \mu_{j'}$ Hay interacción.

#### Prueba de Bondad de Ajuste de Kolmogorov-Smirnov (KS)

$H_0$ :	Los datos analizados siguen una distribución $M$ .
$H_1$ :	Los datos analizados no siguen una distribución $M$ .

#### Levene test

$P < 0.05$	se acepta la igualdad de varianzas entre grupos
------------	---

## 7. Resultados

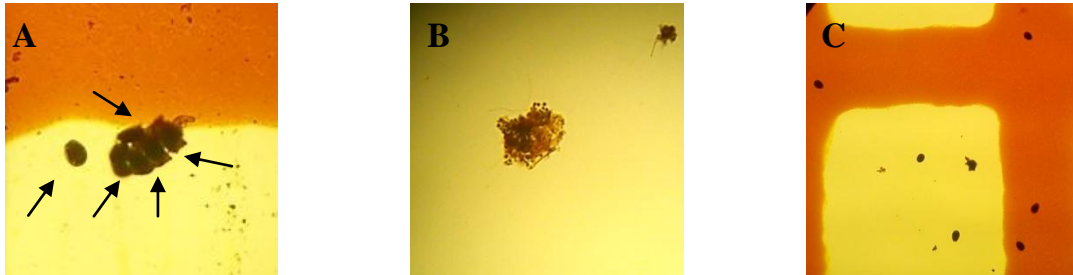
### 7.1 Análisis de las unidades experimentales y determinación de la respuesta de *C. gigas* en la alimentación, como resultado de la exposición combinada a dinoflagelados tóxicos

En las muestras de agua tomadas de las unidades experimentales durante el bioensayo de exposición de *C. gigas* a tres tratamientos de *P. lima* y *G. catenatum*, se observó la presencia de pseudoheces (partículas de alimento no ingerido embebido en mucus) (Fig. 9), siendo *P. lima* el dinoflagelado predominante. Este comportamiento se observó durante el bioensayo, lo cual indica que los ostiones rechazaron parte del alimento ofrecido (Fig. 9A) y favorecieron la ingestión de *G. catenatum* (Fig. 9B) ya que a las 3 y 6 horas de haberse proporcionado en T2 y T3 había sido filtrado en su totalidad mientras que en T1 esto sucedió hasta las 12 h.

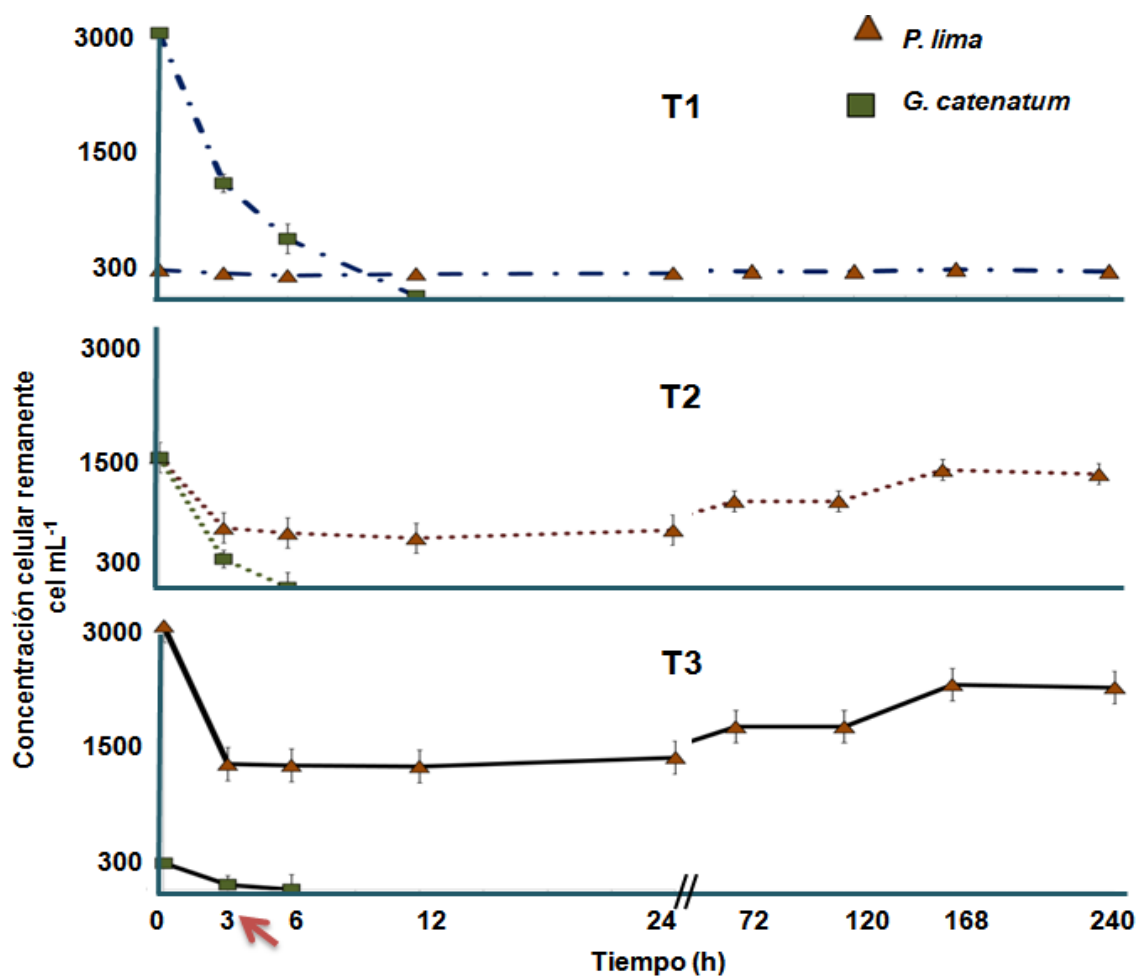
En T1 (suministro del menor número de células de *P. lima*) es evidente el nulo consumo de *P. lima* a lo largo del experimento, sin embargo, en T2 y T3 (suministro de mayor número de células de *P. lima*) la actividad filtradora de *C. gigas* para *P. lima* disminuyó paulatinamente después de las primeras tres horas, manteniéndose constante durante las primeras 24 h. Posteriormente, aumentó en el rechazo de la microalga en T2 y T3, con la misma tendencia a las 72, 120, 168 horas y los 10 días que duró el experimento. Cabe resaltar, que en T2 y T3 se observó la presencia abundante de pseudoheces compuestas por *P. lima* (gráfica 2).

Por otra parte, no se observaron respuestas físicas adversas en los juveniles de *C. gigas* tales como cierre de valvas o retracción de manto (durante las observaciones mediante microscopio estereoscópico siempre se observaron los cilios fuera de las valvas) durante la mayor parte del experimento, en el tratamiento control (alimentados con *I. galbana*) se observó una alta clarificación del agua y abundante formación de heces de los juveniles (Fig. 9C), lo que es un indicio del buen estado de salud de los organismos hasta el final del experimento. Es importante resaltar, que no se observó mortalidad en ninguna de las unidades experimentales correspondientes a los tratamientos. Los conteos celulares y la formación de pseudoheces para cada especie de dinoflagelado, demuestra que *C. gigas*

favoreció (seleccionó) la filtración de una de las especies de dinoflagelados proporcionadas al alimentarse.



**Figura 9.** Análisis microscópico (aumento 10X) del agua de las unidades experimentales durante el bioensayo. A) Formación de pseudoheces de *P. lima*; B) heces normales de *C. gigas* (muestra tomada de una unidad experimental control, alimentados con *I. galbana*); C) después de las 12 horas de bioensayo no se observan células de *G. catenatum*.



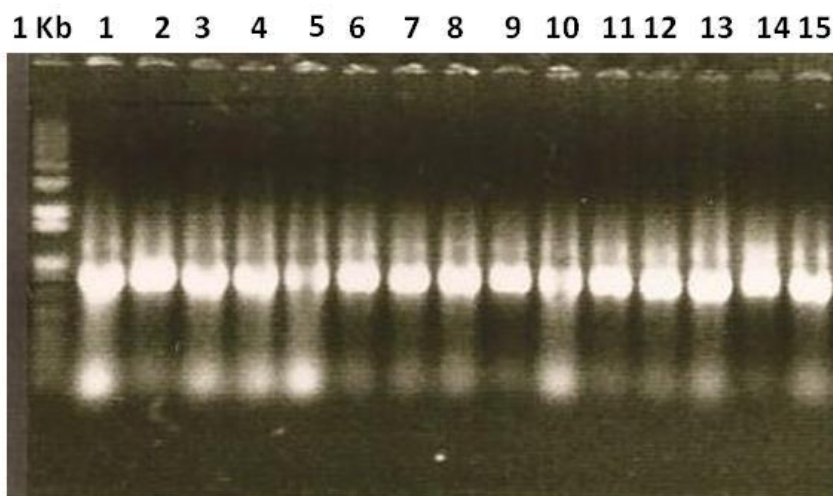
**Gráfica 2.** Filtración de las células de los dinoflagelados tóxicos por juveniles de *C. gigas* en bioensayos de exposición combinada. Código: *P. lima* (*P. l.*), triángulo café; *G. catenatum* (*G. c.*), cuadrado verde; T1, 3000 cel mL<sup>-1</sup> de *G. c.* + 300 cel mL<sup>-1</sup> de *P. l.*; T2, 1500 cel mL<sup>-1</sup> de *G. c.* + 1500 cel mL<sup>-1</sup> de *P. l.*; T3, 300 cel mL<sup>-1</sup> de *G. c.* + 3000 cel mL<sup>-1</sup> de *P. l.*. Los datos representados en la gráfica son el promedio de las réplicas  $\pm$  desviación estándar. La flecha indica la hora en que se observó la formación de pseudoheces de *P. l.* (3 h).

## 7.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): análisis semicuantitativo de genes involucrados en la síntesis de proteínas de estrés y regulación de ácidos nucleicos

### 7.2.1 Extracción y verificación de ARN total

Se obtuvo alta eficiencia de extracción de ARN ya que la concentración promedio obtenida por muestra fluctuó entre 190.7 y 904.3 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ . La cuantificación del ARN se realizó mediante espectrofotometría a 280 nm (NanoDrop ND-2000®, Thermo Scientific) y el coeficiente 260/280 se mantuvo entre 1.99 a 2.01 (coeficientes  $<$  a 1.8 denotan contaminación por proteínas y un coeficiente  $>$  a 2.1 denota la presencia de ADN genómico). Se verificó que el coeficiente 260/230 fuera de entre 1.8 y 2.2, ya que valores menores denotan contaminación por tiocianato de guanidina que inhibe la reacción de PCR (Poma *et al.*, 2012).

En la figura 10 se ejemplifica la calidad del ARN obtenido mediante el análisis en gel de agarosa-Synergel al 1% (en buffer TBE 1X-DEPC) con las condiciones de digitalización estandarizadas, mientras que en la Tabla VIII se muestran los algunos valores que refieren a la alta calidad e integridad del material obtenido.



**Figura 10.** Perfil electroforético en gel de agarosa/Synergel 1% en TBE-DEPC del ARN total obtenido de muestras del bioensayo de exposición de *C. gigas* a la combinación de dinoflagelados tóxicos *P. lima* y *G. catenatum*. En esta fotografía se muestra la integridad del material genético. Código: 1 Kb, marcador peso molecular; 1 al 15, muestras correspondientes a los primeros muestreos del ensayo agudo mostrados en la Tabla VIII.



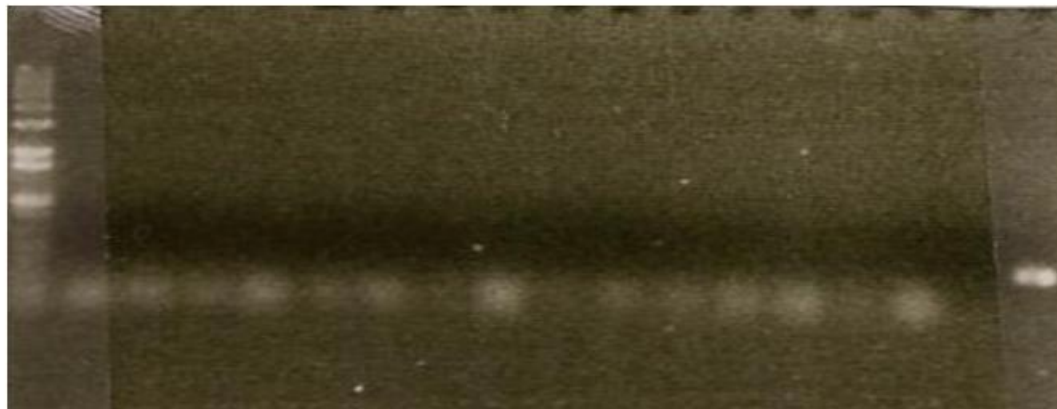
**Tabla VIII.** Características del ARN obtenido de las muestras del bioensayo de exposición de *C. gigas* a la combinación de dinoflagelados tóxicos del bioensayo de exposición a *P. lima* y *G. catenatum*.

#	Muestra	ARN (ng $\mu\text{L}^{-1}$ )	Abs260/280	Abs260/230
1	C1R10h	569.3	2.05	1.78
2	C1R20h	423.4	2.03	1.45
3	C1R30h	565.6	2.06	1.78
4	C2R10h	499.1	1.97	1.52
5	C2R20h	629.2	2.08	1.96
6	C2R30h	560.8	2.03	1.66
7	T1R10h	359.3	2.02	1.63
8	T1R20h	526.7	2.02	1.57
9	T1R30h	444.1	1.7	1.23
10	T2R10h	506	1.97	1.57
11	T2R20h	459.6	1.85	1.58
12	T2R30h	442.8	2.07	1.81
13	T3R10h	509.5	2.06	1.87
14	T3R20h	612.9	2.08	1.63
15	T3R30h	601.4	2.11	1.87

Código de las muestras: ejemplo C1R1-0h C1=tratamiento correspondiente a Control; R1=numero de replica; 0h= tiempo de muestreo

En la figura 11 se muestra el perfil electroforético de los productos de PCR directo (ARN total como templado) usando cebadores universales para el gen 28S ribosomal. La ausencia de amplicones evidencia la ausencia de ADN genómico (ADNg) contaminante (muestras de ARN carriles 1-15), al igual que el control negativo (-) (sin templado). Se observa la correcta formación del producto de PCR en el control positivo (+) empleando ADNg extraído de músculo abductor de *C. gigas*.

1 Kb 1 2 3 4 5 6 8 7 9 10 11 12 13 14 15 (-) (+)



**Figura 11.** Perfil electroforético en gel de agarosa/Synergel al 1% en TBE 1X de productos de PCR directo usando como templado ARN de *C. gigas* (líneas 1-15). Notación: Marcador de peso molecular 1 Kb. Líneas: 1, C1R-0h; 2, C2R1-0h; 3, T1R1-0h; 4, T3R3-3h; 5, T1R3-6h; 6, T2R3-6h; 7, T3R2-6h; 8, T3R3-6h; 9, C1R1-12h; 10, C2R1-12h; 11, T3R2-12h; 12, C1R2-24h; 13, C1R3-24h; 14, C1R2-3d; 15, C2R2-3d (muestras elegidas aleatoriamente, Tabla VIII); (-) control negativo; (+), control positivo

### 7.2.2 Síntesis de ADNc

Como se muestra en la Tabla IX, usando el protocolo descrito en el punto 6.9, se obtuvo alta eficiencia en la síntesis de ADNc (resumen de los resultados de las primeras 28 muestras tratadas). Se realizó un análisis mediante PCR con los productos obtenidos de 3 muestras elegidas aleatoriamente para la verificación de la correcta formación de la hebra de ADNc evidenciando la ausencia de agentes contaminantes que pudieran inhibir las reacciones de amplificación, en la figura 12 se pueden observar los amplicones obtenidos de muestras elegidas aleatoriamente.

**Tabla IX.** Características del ADNc obtenido del bioensayo de exposición a *P. lima* y *G. catenatum*, se muestra la concentración y pureza, así como las relaciones 260/280 y 260/230.

#	Muestra	[ ] ng $\mu\text{L}^{-1}$	260/280	260/230
1	C1R1-0h	1154.4	1.63	1.98
2	C1R2-0h	1143.4	1.62	1.97
3	C1R3-0h	1191.3	1.63	1.99
4	C2R1-0h	1148.6	1.62	1.98
5	C2R2-0h	1153.9	1.62	2.01
6	C2R3-0h	1268.2	1.63	1.97
7	T1R1-0h	1162.5	1.62	1.99
8	T1R2-0h	1242.1	1.62	1.97
9	T1R3-0h	1145	1.62	1.93
10	T2R1-0h	1093.3	1.62	1.96
11	T2R2-0h	1145.6	1.62	1.98
12	T2R3-0h	1164.6	1.63	2
13	T3R1-0h	1097.5	1.64	2.01
14	T3R2-0h	1109.6	1.63	1.98
15	T3R3-0h	1171.8	1.63	1.99

Código de las muestras: ejemplo C1R1-0h C1=tratamiento correspondiente a Control; R1=numero de replica; 0h= tiempo de muestreo.



**Figura 12.** Perfil electroforético de productos de amplificación usando cebadores para el gen 28S ribosomal de *C. gigas* para verificar la correcta síntesis de ADNc. Código: 1 Kb, marcador de peso molecular; 1, muestra T1R3-0h; 2, muestra C1R3-3h; 3, muestra T2R1-3h; (-), control negativo, sin templado; (+), control positivo, con ADNg como templado. Del código de las muestras: ejemplo T1R3-0h T1=tratamiento correspondiente; R3=numero de replica; 0h= tiempo de muestreo.

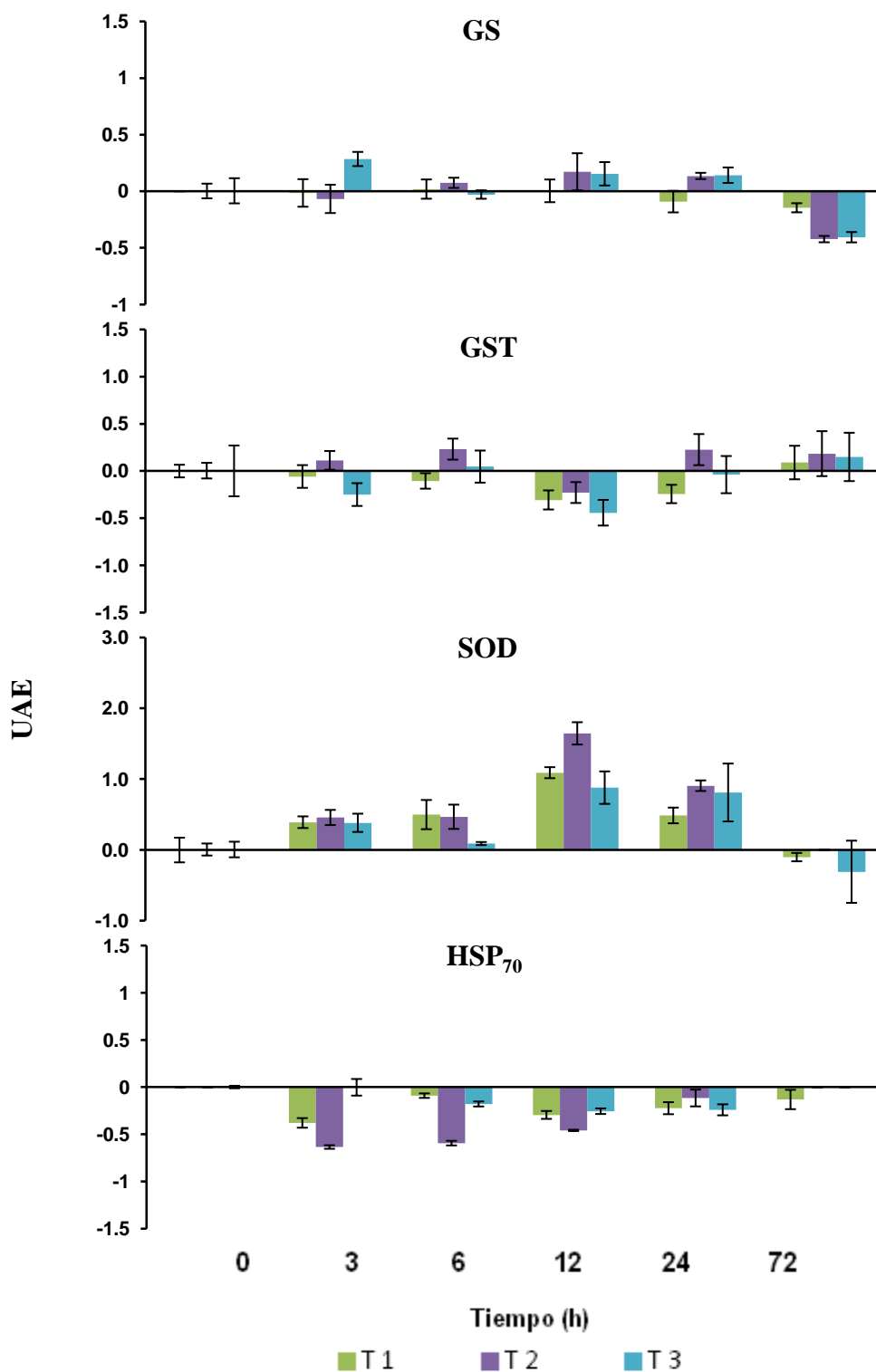
### 7.2.3 Análisis de la expresión de genes de respuesta a estrés y de regulación de ácidos nucleicos mediante RT-PCR

El grupo de genes de respuesta a estrés estudiado consistió de los genes que codifican las GS, GST, HSP<sub>70</sub> y SOD, y como gen de regulación de ácidos nucleicos se trabajó con el P55. Los resultados de este análisis semicuantitativo se muestran gráficamente en las figuras 13 y 14, en las que el eje de las abscisas representa el tiempo en horas y en el eje de las ordenadas la tasa de expresión en unidades Arbitrarias de Expresión (UAE). El eje horizontal primario (0.0) denota el comportamiento normalizado del grupo control (organismos alimentados con la microalga *I. galbana*, TC2) para cada gen, de manera que a los valores normalizados de los tratamientos (T1 - T3) se les restó el valor de TC2, por lo que los valores por encima de este eje denotan una sobreexpresión y los valores por debajo represión de la expresión del gen analizado. En la Tabla X se muestra un resumen de los resultados del análisis estadístico de los datos.

En el análisis semicuantitativo de expresión del gen GS, los resultados del análisis estadístico arrojaron diferencias significativas entre tratamientos y control, es decir, las exposición a los dinoflagelados afecta la expresión del gen GS. Sin embargo, en un análisis *a posteriori* se encontró que no hay diferencias significativas entre T1 y TC2, presentándose estas diferencias únicamente entre T2, T3 y TC2 (Tabla X). Además, se encontraron semejanzas en el efecto entre T2 y T3 en *C. gigas*, siendo estos los tratamientos en los que se proporcionó un mayor número de células de *P. lima* (1500 y 3000 cel mL<sup>-1</sup>, respectivamente).

De manera general, se observa que a las 3, 6, 12 y 24 h hay un aumento en la tasa de expresión (respecto a TC2) en los tratamientos T2 y T3, y para las 72 h represión de la expresión de GS en los tres tratamientos, siendo más evidente en T2 y T3 (Fig. 13).

En los niveles de expresión del gen GST se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (T1 - T3) y control (TC2). Sin embargo, a diferencia de GS en GST T1 produjo un efecto en la expresión, pero diferente al de T2 y T3 (que se comportan de forma semejante) remarcando el hecho de que en estos últimos dos grupos se suministró un mayor número de células de *P. lima*.



**Figura 13.** Análisis de expresión de genes de proteínas de respuesta a estrés de *C. gigas*, expuesto a tres tratamientos (combinación de *G. catenatum* y *P. lima*) mediante RT-PCR semicuantitativo. Notación: GS, Glutamina sintetasa; GST, Glutación S transferasa; SOD,

CuZn Superóxido dismutasa; HSP<sub>70</sub>, proteína Heat Shock 70; UAE, Unidades Arbitrarias de Expresión; T1, tratamiento 1 (verde); T2, tratamiento 2 (morado); T3, tratamiento 3 (azul).

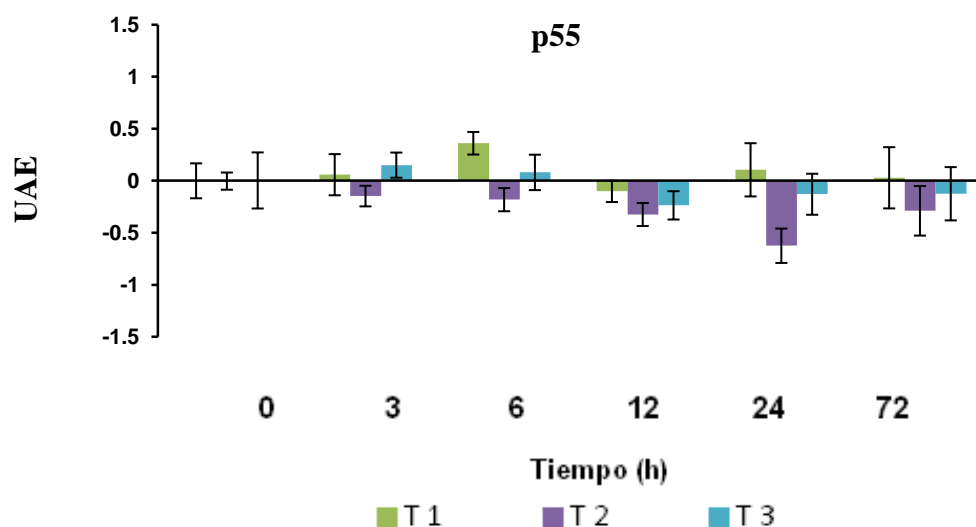
De manera general la tendencia del comportamiento en T1 a las 3, 6 y 72 h fue semejante a la del TC2, observándose sólo a las 12 y 24 h un efecto de represión. Con el T2 se apreció una sobreexpresión a las 3 y 6 h, posteriormente (12 h) represión, y luego a las 24 y 72 h se observó nuevamente un incremento en la expresión. Para T3 se observó una represión a las 3 h, luego se alcanza la misma tasa de expresión que TC2 a las 6 h, posteriormente (12 h) la expresión se volvió a reprimir, y a las 24 h se alcanzó el mismo comportamiento que TC2 (Fig. 13).

La expresión de la SOD, presentó diferencias significativas entre tratamientos y control (Tabla X), encontrándose semejanzas en los efectos entre T1, T2 y T3. La tendencia del comportamiento en la expresión génica fue de sobreexpresarse hasta las 24 h, presentándose un pico máximo a las 12 h (para los tres tratamientos, siendo más evidente para T2). A las 72 h en T1 y T2 la expresión observada alcanzó los niveles de TC2, y represión en el T3 (Fig. 13).

Para el gen HSP<sub>70</sub> se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y el control, en este caso se encontró que los efectos de T1 y T3 son semejantes (Tabla X). En todos los tratamientos y en todos los tiempos de muestreo se observó una tendencia a la represión de la expresión (Fig. 13). Para el T1 a las 3 h se observó la represión más alta, posteriormente a las 6 h la expresión se acercó a la observada en TC2. Del mismo modo, en T2 se apreció el pico de represión más alto a las 3 h que se mantuvo durante las 6 y 12 h, para luego alcanzar valores cercanos a TC2 a las 24 y 72 h. En T3 la represión empezó a observarse a partir de las 6 h manteniéndose con esta tendencia durante las 12 y 24 h, para posteriormente alcanzar la expresión observada en TC2.

Para el gen P55 (Fig. 14) los resultados del análisis estadístico arrojaron diferencias significativas entre tratamientos y control, se encontraron semejanzas en los efectos entre T2 y T3 (Tabla X). Para T1 la tendencia del comportamiento se acercó a la expresión de TC2 a las 3, 12, 24 y 72 h, con un pico máximo de expresión a las 6 h y una represión a las 12 h (que se mantuvo cercana al valor de TC2). Para T2 la tendencia observada fue de

represión en la expresión a partir de las 3 h, condición que se mantuvo hasta las 72 h; el pico máximo de represión se ubicó a las 24 h. En T3 se observó sobreexpresión a las 3 y 6 h, después de este tiempo la tendencia del comportamiento fue de represión a las 12, 24 y 72 h (a las 12 h se registró el pico más alto de represión).



**Figura 14.** Expresión relativa mediante la técnica de RT-PCR semicuantitativo del gen P55 involucrado en la regulación de ácidos nucleicos y la división celular. Notación: UAE, Unidades Arbitrarias de Expresión; T1, tratamiento 1 (verde); T2, tratamiento 2 (morado); T3, tratamiento 3 (azul).

Al realizar el análisis estadístico de los resultados semicuantitativos obtenidos al obtener el valor numérico mediante análisis densitométricos de los amplicones productos de PCR (Tabla X), se observó un comportamiento sumamente interesante de los juveniles de *C. gigas* al estar expuesto a una simulación de un evento FAN conformado por especies de dinoflagelados tóxicos productores de toxinas de diferente naturaleza físico-química. Se aplicó un ANOVA para detectar las diferencias entre los tratamientos y el grupo control; para todos los genes se encontraron diferencias entre los tratamientos. En el análisis *a posteriori* en el que se empleó el test de Tukey para identificar los tratamientos donde se encuentran las diferencias significativas, se observó que para los genes GS, GST y P55 hay un efecto similar provocado por los tratamientos T2 y T3, resaltando el hecho de que son los tratamientos donde se proporcionó un mayor número de células de *P. lima* ( $1.5 \times 10^2$  y

$3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>, respectivamente). De acuerdo con las observaciones en las muestras de agua de las unidades experimentales *P. lima* es el dinoflagelado al que *C. gigas* empezó a rechazar en forma de pseudoheces durante las primeras horas de exposición, este rechazo se incrementó al paso de las horas de exposición, al séptimo día se observó el pico máximo de rechazo hacia el filtrado de esta microalga.

**Tabla X.** Resumen de resultados del análisis estadístico *a posteriori* mediante el test de Tukey para el análisis de expresión de algunos genes involucrados en la síntesis de proteínas de estrés y de regulación de ácidos nucleicos en *C. gigas* expuesto a una combinación de los dinoflagelados tóxicos *P. lima* y *G. catenatum* mediante la técnica de PCR semicuantitativo (RT-PCR).

### Análisis estadísticos RT-PCR

	EFECTO							
	GRUPO	TRATAMIENTOS	TIEMPO-TRATAMIENTO					
			0	3	6	12	24	72
GS	C	A	a					
	T 1	A	a	a	b	c	d	a
	T 2	B	a	b	b	c	d	e
	T 3	B	a	b	a	c	b	d
GST	C	A	a					
	T 1	B	a	b	c	a	a	c
	T 2	C	a	a	b	a	c	d
	T 3	C	a	c	b	a	c	d
SOD	C	A	a					
	T 1	B	a	a	b	c	d	a
	T 2	B	a	b	a	c	d	a
	T 3	B	a	a	a	a	b	c
HSP <sub>70</sub>	C	A	a					
	T 1	B	a	b	c	d	e	d
	T 2	C	a	b	c	d	e	a
	T 3	B	a	b	c	d	e	a
P55	C	A	a					
	T 1	B	a	a	b	a	a	a
	T 2	C	b	a	a	a	b	a
	T 3	C	a	b	a	a	a	a

En mayúsculas se representan las diferencias significativas entre tratamientos y el control, en minúsculas el efecto de interacción entre tiempo y tratamiento. Letras semejantes representan semejanzas entre los distintos grupos tratamientos. Se representa con la letra A (a) al grupo control. Se fijó una significancia estadística de  $p < 0.05$ .



### 7.2.4 Contraste de análisis de expresión a exposiciones individualizadas de *C. gigas* a *G. catenatum* y *P. lima*

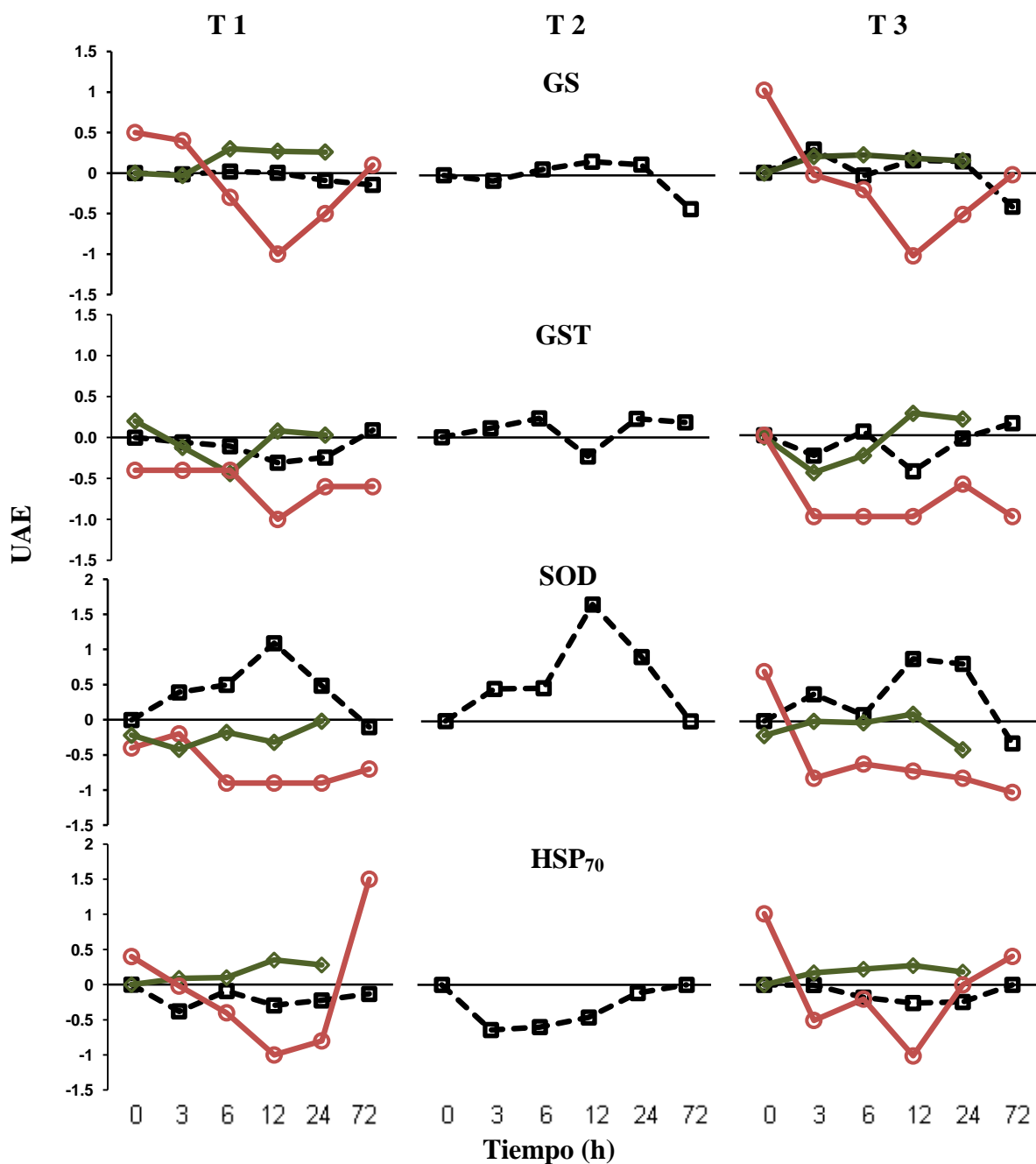
Para evaluar el efecto combinado de las toxinas producidas por los dinoflagelados tóxicos *P. lima* y *G. catenatum* al ser consumidos por *C. gigas*, los datos que se generaron en este trabajo se compararon con aquellas tasas de expresión obtenidas en bioensayos de exposición simple (unialgal, una especie de dinoflagelado tóxico) con las mismas especies y cepas de microalgas tóxicas a concentraciones celulares de  $3 \times 10^2$  y  $3 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> (Romero-Geraldo, 2012 y García-Lagunas, datos no publicados; Tabla XI), con la finalidad de validar la hipótesis de trabajo planteada, en la que se consideraron los diferentes efectos de acuerdo a investigaciones toxicológicas en las que se estudian los efectos de combinaciones de sustancias tóxicas en un organismo (sinérgico, aditivo y/antagónico).

**Tabla XI.** Concentraciones de dinoflagelados usadas en bioensayos de exposición unialgal o combinada.

<b>Contraste de expresión.</b>				
Este estudio		Estudios previos		
<i>G. catenatum</i> ( <i>G.c</i> ) + <i>P. lima</i> ( <i>P.l</i> )		<i>G. catenatum</i> <sup>a</sup>	<i>P. lima</i> <sup>b</sup>	
<b>Tratamiento</b>	<b>Concentración celular (cel mL<sup>-1</sup>)</b>			
<b>T1</b>	$3 \times 10^3$ de <i>G.c</i> + $3 \times 10^2$ <i>P.l</i>	vs	$3 \times 10^3$ de <i>G.c</i>	$3 \times 10^2$ <i>P.l</i>
<b>T2</b>	$1.5 \times 10^3$ <i>G.c</i> + $1.5 \times 10^3$ <i>P.l</i>	vs	NA	NA
<b>T3</b>	$3 \times 10^2$ <i>G. c</i> + $3 \times 10^3$ <i>P.l</i>	vs	$3 \times 10^2$ <i>G.c</i>	$3 \times 10^3$ <i>P.l</i>

(<sup>a</sup> García-Lagunas y Hernández-Saavedra, en revisión; <sup>b</sup> Romero-Geraldo y Hernández-Saavedra, 2012)

En la figura 15 se presentan gráficamente las tasas de expresión de genes de *C. gigas* expuesto a dinoflagelados tóxicos en diversas condiciones (concentración y/o especie) y en la Tabla XII se resume el contraste de expresión.



**Figura 15.** Contraste del efecto de la exposición combinada de dinoflagelados tóxicos *G. catenatum* y *P. lima* (PSP+DSP, en línea punteada negra) en la expresión de genes involucrados en respuesta generalizada a estrés ante una exposición individualizada a dinoflagelados productores de toxinas: *G. catenatum* (PSP, en línea sólida verde) y *P. lima* (DSP, en línea sólida café). Notación: en cada nivel o renglón se representa la tasa de expresión de cada gen analizado, GS, GST, SOD, HSP<sub>70</sub>; en cada columna se representan los distintos tratamientos, T 1, tratamiento 1; T 2, tratamiento 2; T 3, tratamiento 3. En la ordenada, Unidades Arbitrarias de Expresión (UAE); en la abscisa, tiempo en horas.

**Tabla XII.** Resumen del efecto de la exposición combinada de *C. gigas* a dinoflagelados tóxicos productores de toxinas.

<b>Gen</b>	<b>Efecto observado de la combinación. (<i>P. lima</i> + <i>G. catenatum</i>)</b>	<b>Tendencia global del comportamiento a la exposición individualizada de <i>C. gigas</i> a <i>P. lima</i> o <i>G. catenatum</i>.</b>
<b>GS</b>	Antagónico	A ninguno
<b>GST</b>	Antagónico	Semejante a <i>P. lima</i>
<b>SOD</b>	Sinérgico	A ninguno
<b>HSP<sub>70</sub></b>	Antagónico	Semejante a <i>P. lima</i>

Para el gen GS se observó una tendencia de la expresión a mantenerse cerca del eje central horizontal en el tratamiento T1. En T3 se observó un efecto similar al comportamiento encontrado en la exposición individualizada a *G. catenatum* durante las primeras 3 h, a las 6 h cayó semejándose al comportamiento encontrado al exponer a *C. gigas* a *P. lima*, a las 12 y 24 h volvió a asemejarse a la respuesta a *G. catenatum*, y a las 72 h se presentó el punto crítico donde se observó la mayor represión en la tasa de expresión para este gen. De manera global, los resultados sugieren un efecto antagónico de *P. lima* y *G. catenatum* ya que la respuesta en la tasa de expresión de GS en *C. gigas* se presentó con tendencia a mantenerse en la línea que representa el comportamiento basal de organismos alimentados solamente con *I. galbana*.

Para el gen GST los puntos críticos (más alejados de la línea central basal) se presentaron a las 12 h para el tratamiento T1 y a las 3 y 12 h para T3. Para T1 se observó un comportamiento cercano al estado de los organismos control (TC2) durante las primeras 6 h, después de las 12 h de exposición se observó una tendencia a alejarse del estado basal (asemejándose a la respuesta de *C. gigas* a la exposición de *P. lima*), regresando al estado basal a las 72 h. Para T3 para los tres casos de exposición (individualizada y combinada) se observó una represión de la expresión, sin embargo, a las cero, 3 y 6 h se apreció una tendencia similar a la observada en *C. gigas* expuesto a *G. catenatum* y a las 12 h la expresión de GS se asemejó a la encontrada en la exposición a *P. lima*. La respuesta global en este gen sugiere en *C. gigas* un efecto antagónico ante una combinación de dinoflagelados tóxicos, ya que la tendencia de la tasa de expresión se mantuvo cercana al estado basal de los organismos control TC2 alimentados con *I. galbana*.

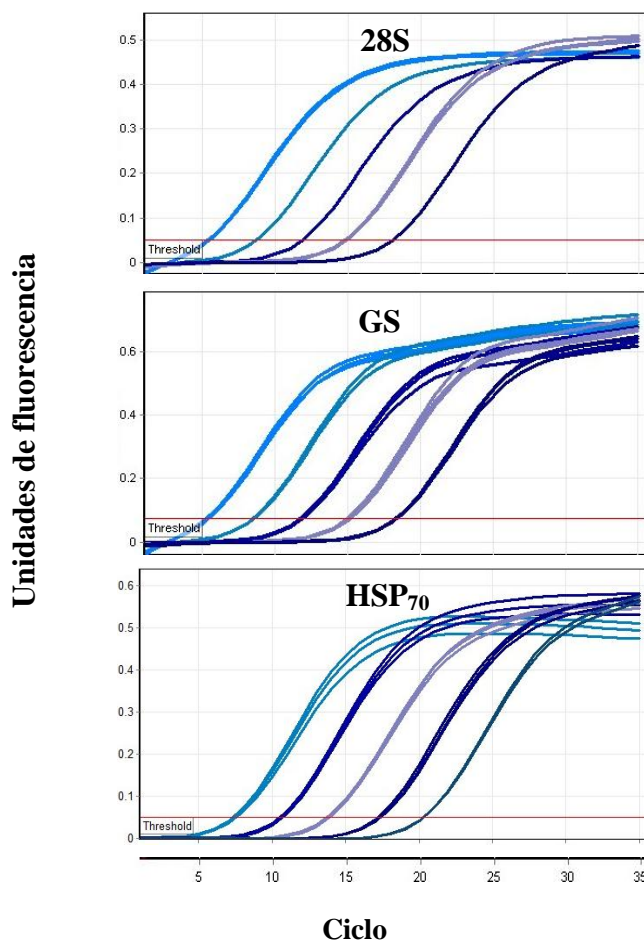
Para el gen SOD, los puntos críticos en la tasa de expresión se observaron a las 12 h en T1 y a las 12 y 24 h en T3. Para T1 se observó un aumento en la tasa de expresión a las 3 h hasta llegar a las 12 h de exposición, después se observó una disminución en la expresión hasta llegar al estado basal. Con el T3 se observó un aumento en la expresión a las 3 h, posteriormente la tasa de expresión regresa al estado basal a las 6 h, aumentando después hasta llegar al punto máximo a las 12 h manteniéndose hasta las 24 h y regresando al estado basal a las 72 h. En este gen se observó un comportamiento global sinérgico de *P. lima* y *G. catenatum* en *C. gigas*, manteniendo un comportamiento diferente a los observados a la exposición individual.

Para el gen HSP<sub>70</sub> se observó un efecto de represión en la tasa de expresión en los tres tratamientos desde el inicio del bioensayo hasta las 72 h cuando volvió al estado basal de expresión. Con el T3 se observó el mismo comportamiento, remarcando el hecho de que la tendencia del efecto de la exposición combinada fue semejante a la observada a la exposición de *C. gigas* a *P. lima* de manera individual. De manera general, el efecto que sugiere el resultado gráfico es una respuesta de tipo antagónico ante la presencia de ambos dinoflagelados.

## **7.2.5 Análisis específico mediante qPCR tiempo real de genes de respuesta a estrés**

### **7.2.5.1 Estandarización de reacción de qPCR**

La generación de curvas estándar para evaluar la eficiencia de reacción a través de diluciones seriadas de ADNc permitió la generación de curvas paralelas, esto también con la finalidad de conocer el intervalo de concentración de ADNc en el que la fluorescencia se incrementa proporcionalmente en función de la concentración inicial del templado (Fig. 16). Esto permitió la validación del método ya que se obtuvieron valores de eficiencia en un rango de 95% a 100%. La validación se desarrolló con diluciones seriadas 1:10 partiendo de una concentración inicial de 100 ng de ADNc ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ) en las que se obtuvieron separaciones cuya pendiente fue cercana a -3.3 (Tabla XIII); a partir de estas graficas se encontró que la concentración apropiada para conducir el análisis qPCR es de  $0.1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  (dilución  $10^{-3}$ ).



**Figura 16.** Curvas estándar de algunos genes analizados por PCR tiempo real.

La especificidad de los amplicones obtenidos en las distintas diluciones se corroboró mediante las curvas de disociación en un gradiente térmico, las cuales fueron desarrolladas para cada gen evaluado. La temperatura media de disociación para el amplicón correspondiente para algunos genes analizados se muestran en la Tabla XIV, en todos los casos no se observó evidencia de dimerización para cada par de primers durante la reacción de PCR en las diluciones altas ni en los controles negativos (sin templado) para cada reacción.

**Tabla XIII.** Resumen de la estandarización y validación de reacción de qPCR a partir de diluciones seriadas de ADNc obtenido de un concentrado de 5 organismos de *C. gigas*, para algunos de los genes analizados.

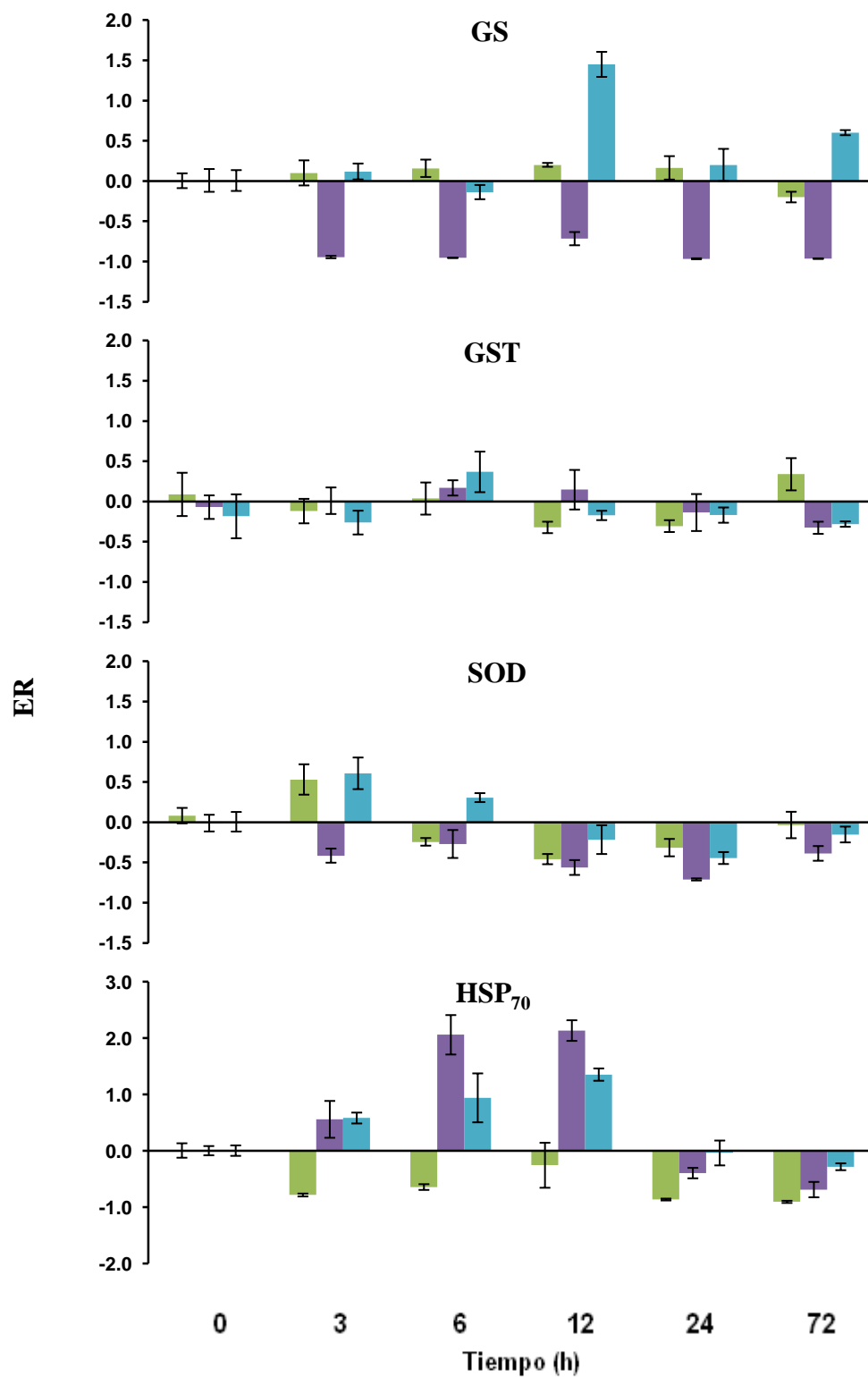
Grupo de genes	Gen	Pendiente	Eficiencia	R <sup>2</sup>	Pico Melt °C
Proteínas de estrés	GS	-3.14	1.07	0.999	87
	HSP <sub>70</sub>	-3.26	1.02	0.999	82
Regulación de ácidos nucleicos	P55	-3.24	1.03	0.999	83
Control	28S	-3.21	1.04	0.999	84

### 7.2.5.2 Análisis cuantitativo de expresión mediante qPCR

En la figura 17 se presenta la representación gráfica de los resultados del análisis cuantitativo de la expresión de los genes GS, GST, SOD y HSP<sub>70</sub> involucrados en la síntesis de proteínas de estrés, y en la figura 18 los correspondientes al gen P55. En la Tabla XIV se muestran los resultados del análisis estadístico donde se analiza los efectos: concentración celular y concentración celular-tiempo.

Para el gen GS el análisis estadístico arrojó diferencias significativas entre tratamientos y control. Para T1 se observó un comportamiento estadístico semejante al grupo control (TC2) el cual está representado por la línea central horizontal; no presentó pico de expresión en ningún tiempo de muestreo. Para T2, la tendencia fue de represión de la expresión a partir de la 3 h y hasta las 72 h, presentó diferencias significativas con respecto al control y entre T1 y T3. En T3 durante los primeros 3 tiempos de muestreo se observó un comportamiento semejante a la del grupo control, se apreció un pico máximo de expresión a las 12 h, posteriormente disminuyó a niveles cercanos al grupo control (24 h) para posteriormente incrementarse a las 72 h.

Para el gen GST, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y control, sin embargo, no hubo diferencias entre los tratamientos. Con el T1 se observó un fenómeno de represión a las 12 y 24 h, presentó un aumento en el nivel de expresión a las 72 h. Con el T2 se pudo apreciar sobreexpresión a las 6 y 12 h, reprimiéndose luego a las 24 y 72 h. En T3, se observó una tendencia de represión, presentando únicamente un incremento en la expresión a las 6 h (pico máximo).



**Figura 17.** Análisis de expresión relativa mediante la técnica de qPCR de genes involucrados en la síntesis de proteínas de estrés. Notación: ER, Expresión relativa; T1, tratamiento 1 (verde); T2, tratamiento 2 (morado); T3, tratamiento 3 (azul).

**Tabla XIV.** Resumen de resultados de análisis estadístico *a posteriori* mediante el test de Tukey para el análisis de expresión de algunos genes involucrados en la síntesis de proteínas de estrés y de regulación de ácidos nucleicos en *C. gigas* expuesto a una combinación de los dinoflagelados tóxicos *P. lima* y *G. catenatum* mediante la técnica de qPCR.

### Análisis estadísticos qPCR

		EFECTO							
	GRUPO	TRATAMIENTOS	TIEMPO-TRATAMIENTO						
			0	3	6	12	24	72	
GS	C	A	a						
	T 1	A	a	a	a	a	a	a	a
	T 2		B	a	b	c	d	e	e
	T 3		C	a	a	a	b	a	c
GST	C	A	a						
	T 1		B	a	a	a	a	a	a
	T 2		B	a	a	a	a	a	a
	T 3		B	a	a	a	a	a	a
SOD	C	A	a						
	T 1		B	a	a	a	a	a	a
	T 2		C	a	a	a	b	c	a
	T 3		B	a	a	a	a	a	a
HSP <sub>70</sub>	C	A	a						
	T 1		B	a	b	a	a	c	d
	T 2		C	a	a	b	c	a	d
	T 3		D	a	a	a	b	a	a
P55	C	A	a						
	T 1		B	a	a	b	a	a	a
	T 2		C	b	a	a	a	b	a
	T 3		D	a	b	a	a	a	a

En mayúsculas se representa las diferencias significativas entre tratamientos y control, en minúsculas el efecto de interacción entre tiempo y tratamiento. Letras semejantes representa semejanzas entre los distintos grupos tratamientos. Se representa con la letra A (a) al grupo control. Significancia estadística  $p > 0.05$ .

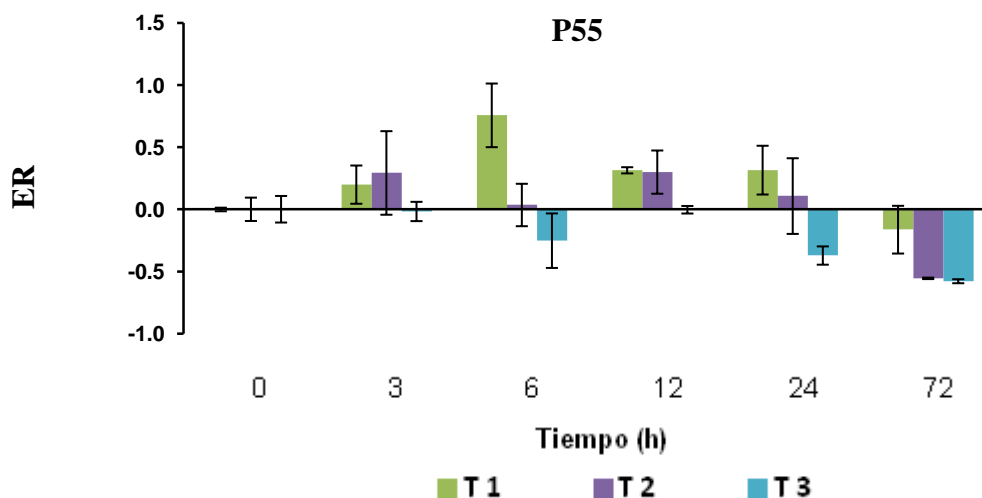
Para el gen SOD se encontraron diferencias significativas entre tratamientos y control, presentando semejanza en el efecto entre los tratamientos T1 y T3 (predominancia de una de las especies). En T1 se observó sobreexpresión a las 3 h de haber iniciado el experimento, posteriormente la tendencia fue de represión de la expresión a partir de las 6 h, alcanzando el mismo nivel que el control a las 72. Para T2 la tendencia observada del efecto de la combinación del mismo número de células de 2 especies de dinoflagelados



tóxicos fue de represión a lo largo del experimento, presentándose la tasa de expresión más baja a las 24 h. Con el T3 los picos de sobreexpresión se presentaron a las 3 y 6 h, tiempo después del cual la tendencia fue de represión hasta el final del bioensayo.

En la expresión del gen HSP<sub>70</sub> se encontraron diferencias significativas entre tratamientos y control, así como entre tratamientos (todos con diferente efecto en *C. gigas*). Para T1 la tendencia a lo largo de las 72 h fue de represión, para T2 la tendencia fue la sobreexpresión hasta las 12 h, después la expresión se reprimió por debajo del estado basal (TC2). En el T3 se presentó un aumento en la tasa de expresión a partir de las 3 h, con un pico máximo a las 12 h, posteriormente alcanzó la misma tasa de expresión que en el control (TC2) a las 24 h, presentando una ligera variación a las 72 h.

Para el gen de regulación de ácidos nucleicos P55 (figura 18), las diferencias con significancia estadística se presentaron entre tratamientos (todos con diferente efecto en *C. gigas*) y el control. Para el T1 se observó un aumento en la tasa de expresión a partir de las 3 h y hasta las 24 h, posteriormente se reprimió a las 72 h. En T2 se presentó un aumento en la tasa de expresión a las 3 h, a las 6 h la expresión es similar a la del TC2. A las, 12 y 24 h la cantidad de transcritos se incremento, y posteriormente (a las 72 h) su nivel disminuyó. En T3 la tendencia global del comportamiento que fue observado fue el de represión, pero a las 3 y 12 h alcanzó el mismo nivel de expresión que el grupo control.



**Figura 18.** Expresión relativa del gen P55 mediante qPCR. Notación: ER, Expresión relativa; T1, tratamiento 1 (verde); T2, tratamiento 2 (morado); T3, tratamiento 3 (azul).

## 8. Discusión

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

*C. gigas* es un organismo filtroalimentador que obtiene su alimento de las partículas que se encuentran en suspensión en los dinámicos y productivos sistemas acuáticos, donde las relaciones con el fitoplancton son muy estrechas (Estrada, 2005). La habilidad de los moluscos bivalvos de modificar su alimentación y comportamiento digestivo en respuesta a los cambios en cantidad y calidad de partículas en suspensión de su medio es bien conocida, se han observado diferentes respuestas en el comportamiento en bivalvos filtro alimentadores (Bricelj y Shumway, 1998), pero todos ellos presentan alteraciones en la filtración, afectando la eficiencia de retención de partículas cuando son expuestas a dinoflagelados tóxicos (Shumway, 1991; Hégaret *et al.*, 2007; Estrada *et al.*, 2007b; Leverone *et al.*, 2007; Contreras *et al.*, 2011). En varios estudios se ha reportado la respuesta fisiológica de *C. gigas* al ser expuesto a simulaciones de floraciones algales nocivas, en estos trabajos las principales observaciones han sido la disminución en la filtración e ingestión, así como cambios en la biodeposición al observarse la producción de pseudoheces (Shumway, 1991; Blanco *et al.*, 1997; Bougrier *et al.*, 1997; Hégaret *et al.*, 2007). En este trabajo se trató de emular (con sus obvias limitaciones) el escenario al que se enfrentan los organismos en el ambiente marino durante el desarrollo de un evento FAN (con coexistencia de especies), con la finalidad de evaluar los dos principales factores que podrían afectar la homeostasis de *C. gigas*: el tiempo de exposición y la concentración/proporción de microalgas tóxicas.

Para evaluar el tiempo como variable, se establecieron dos escenarios de exposición: con un escenario agudo (24 h de duración) se obtuvo la información de la respuesta inmediata de *C. gigas* ante la presencia de los dinoflagelados tóxicos, mientras que en el escenario sub-crónico (10 días de duración) se observó el efecto acumulado en un escenario donde se simuló un evento FAN de duración intermedia. La duración de un evento FAN puede ir de horas a días, sin embargo, la duración de un evento FAN en el ambiente marino esta directamente influenciada por las condiciones físico-químicas del ambiente acuático y el clima (Anderson, 2007). En el factor concentración celular como

variable se empleó una concentración celular baja (300 cel mL) que representó el inicio de la formación de un evento FAN, ya en concentraciones de entre 1500 y 3000 cel mL se ha observado discoloración del mar, así como efectos patológicos que pueden variar desde anoxia (en eventos no tóxicos) a y la incorporación de toxinas a la red trófica causando casos de mortandad de especies marinas (como moluscos, crustáceos, peces, pájaros y mamíferos marinos) en eventos tóxicos (Zingone y Enevoldsen, 2000).

En este trabajo se encontró que para alimentarse *C. gigas* es capaz de seleccionar a *G. catenatum* (*G.c*) sobre *P. lima* (*P.l*) cuando se ofrece una combinación de estos dinoflagelados tóxicos en diferentes proporciones: T1, *G.c* 300 + *P.l* 3000; T2, *G.c* 1500 + *P.l* 1500; y T3, *G.c* 3000 + *P.l* 300 (cel mL<sup>-1</sup>). En los tres tratamientos *C. gigas* removió completamente a *G. catenatum*, mostrando un comportamiento muy selectivo al disminuir la filtración de *P. lima* al cual rechazó en forma de pseudoheces; este comportamiento aumentó gradualmente a través del tiempo (de cero a 10 días de exposición a la mezcla de dinoflagelados); estos resultados concuerdan con las observaciones de García-Lagunas (2011). En ese trabajo se expuso a juveniles de *C. gigas* a tres concentraciones de *G. catenatum*, observándose que a bajas concentraciones del dinoflagelado (300 y 3 000 cel mL<sup>-1</sup>) las células fueron totalmente removidas del medio sin presentar la formación de pseudoheces, la biodeposición solo se observó cuando las ostras fueron expuestas a una densidad celular de 30 000 cel mL<sup>-1</sup>. Por otra parte, Romero-Geraldo (2010) observó el mismo comportamiento usando las mismas concentraciones de microalgas, solo que ella uso como modelo de estudio *P. lima*. En estos trabajos el efecto de formación de pseudoheces fue más evidente a una alta concentración de las células tóxicas (30 000 cel mL<sup>-1</sup>), condición en la que también se presentaron señales visibles de estrés fisiológico como cierre parcial de valvas, retracción del manto (frente a *G. catenatum*) y disminución de la tasa de aclaramiento, siendo indicativo de que *C. gigas* reguló su alimentación como mecanismo de defensa ante la presencia de células tóxicas.

El hecho de que los ostiones retuvieron en su totalidad a *G. catenatum* representa una eficiencia de 100%. En bivalvos, este nivel de eficiencia se alcanza generalmente con partículas mayores de 7 µm, ya que se ha demostrado que en general estos organismos prefieren filtrar partículas grandes que pequeñas y partículas ligeras que densas (Brillant y

MacDonald, 2000). El tamaño de los dinoflagelados suministrados coincide, estando en un promedio que va entre 30 y 45  $\mu\text{m}$  de largo y ancho (FAO, 2005), por lo que este parámetro no podría explicar el hecho de que el ostión una especie sobre la otra, en este caso entran en juego otras propiedades cualitativas de las microalgas.

La selección de partículas en suspensión está controlada por diversos factores físicos, químicos y biológicos en el ambiente natural y se ha demostrado que la densidad, cargas electrostáticas y la concentración de partículas pueden afectar la selección de alimento en moluscos bivalvos, además de que la composición química representa un importante factor en la elección del alimento (Bougrier *et al.*, 1997; Cognie *et al.*, 2001; López, 2003; Ward y Shumway, 2004). Entre los factores químicos involucrados se puede mencionar la presencia de metabolitos secundarios en el fitoplancton (ácidos grasos, pigmentos o toxinas), además de los carbohidratos que envuelven la superficie de las células microalgales, que a menudo se producen en la fase estacionaria del crecimiento algal y como respuesta a la disminución de nutrientes (Pales-Espinosa *et al.*, 2008); sin embargo, el mecanismo de la selección preingestiva aun no ha sido dilucidado (Tran *et al.*, 2010). El uso de técnicas histológicas e imágenes de microscopio electrónico (en combinación con endoscopía), ha permitido la observación *in vivo* de las branquias de bivalvos como *Mulinia edulis* y *Mytilus chilensis*, lo que ha contribuido significativamente a entender los aspectos básicos del funcionamiento del aparato filtrador de los bivalvos (Garrido *et al.*, 2012).

Como se observó en nuestro estudio, el hecho de que *C. gigas* haya filtrado totalmente a *G. catenatum* sin presentar signos de rechazo de las partículas en forma de pseudoheces, se puede explicar en base a la variación genética implicada en la micro anatomía de los canales de sodio, lo que manifiesta la existencia de especies de moluscos bivalvos resistentes y no resistentes a toxinas paralizantes como la saxitoxina (Tran *et al.*, 2010). Las especies de moluscos bivalvos resistentes son insensibles a toxinas PSP y no modifican su actividad filtradora ni muestran cierre diferencial de valvas, lo que permite la acumulación de toxinas indiscriminadamente en los tejidos (Bricelj *et al.*, 1991). Por un lado, se han descrito especies resistentes como *M. edulis* que pueden acumular estas ficotoxinas en grandes concentraciones, y por otro lado especies altamente sensibles como

la almeja *Mercenaria mercenaria* o la escalopa *Argopecten irradians*, que exhiben diversos mecanismos fisiológicos cambiando su comportamiento en la capacidad de filtración y cerrando rápidamente sus valvas con la finalidad de evitar el contacto con especies productoras de toxinas PSP (Gainey y Shumway, 1988). *C. gigas* esta descrita como una especie intermedia en términos de sensibilidad a toxinas PSP (Bricelj y Shumway, 1998), este estatus intermediario podría explicar el motivo por el que de una mezcla de dos componentes de dinoflagelados tóxicos (productores de toxinas PSP y DSP) *C. gigas* tenga preferencia por *G. catenatum* que ha sido claramente señalado como productor de toxinas de tipo PSP (Band-Schmidt, 2006). En el caso de *G. catenatum* cepa GCCV-6, en estudios previos realizados por Pérez-Linares *et al.* (2008a; 2008b), se caracterizó la toxicidad de la misma, encontrando que esta cepa produce saxitoxina (STX) en un rango entre 25.7 y 101 pg cel<sup>-1</sup>, así como 4 de sus análogos: dc-saxitoxina (dcSTX), gonyautoxina (GTX2,3; GTX1,4) y neo-saxitoxina (NEO). Se ha observado que el contenido de toxina PSP puede variar entre especies y aun dentro de cepas de la misma especie (Colin y Dam, 2002a). Dentro de ciertos límites, se ha descrito a *G. catenatum* como una especie con alta calidad nutritiva para las especies que son resistentes a sus toxinas (White, 1981), dado que el gasto energético requerido para depurar la toxina podría resultar superior a las ganancias obtenidas por su consumo; de esta forma los organismos se vuelven selectivos y aprovechan el alimento alternativo que los circunda (Colin y Dam, 2002b). Otro punto que podría ser la causa de la baja sensibilidad de *C. gigas* a las toxinas PSP, ya que a corto plazo el ostión usualmente no es afectado por este tipo de toxinas porque sus sistemas muscular y nervioso operan principalmente a través de canales de calcio (Kao, 1993), siendo el bloqueo selectivo de los canales de sodio el mecanismo de acción de la saxitoxina (FAO, 2005). Pennec *et al.* (2004) demostraron que los canales de sodio están presentes en bajo número en algunos miocitos aislados de músculo cardíaco de *C. gigas*, sugiriendo que no están involucrados en la actividad espontánea de esas células.

El comportamiento selectivo de organismos filtradores ante una combinación de microalgas ya ha sido previamente documentado. Por ejemplo, Bricelj *et al.* (1991) expusieron a *M. mercenaria* a una cepa altamente tóxica de *Alexandrium spp.*, y observaron que la almeja cerró las valvas por lo que el dinoflagelado tóxico no fue filtrado. La

actividad de filtración se restableció cuando el medio fue suministrado con la microalga no tóxica *Thalassiosira weissflogii*. En un estudio similar realizado por Hégaret *et al.* (2007) *M. mercenaria* fue expuesta a una cepa de *Alexandrium spp.* de moderada toxicidad; bajo estas condiciones se observó actividad de filtración aún bajo condiciones de dieta unialgal. La toxina (PSP) probablemente no está directamente involucrada en la respuesta inicial en la alimentación observada en las ostras, pues como lo demostraron Wildish *et al.* (1998) en un estudio realizado al exponer a *C. gigas* a dos cepas de *Alexandrium pp.* (una toxica y otra no) los ostiones respondieron del mismo modo al ser expuesto a las células, por lo que no se puede generalizar. Otro punto de vista que podría explicar este fenómeno, deriva del trabajo de Blanco y Campos (1988) en el que observaron que *A. tamarense* libera distintos compuestos que son capaces de inhibir el crecimiento de otras especies de dinoflagelados, así como un cultivo unialgal de *I. galbana*.

Un resultado sobresaliente de este trabajo, es la observación de cierto grado de rechazo del ostión hacia *P. lima* en forma de pseudoheces, lo que fue evidente en los tres tratamientos aplicados (T1, T2 y T3), siendo totalmente rechazado en altas concentraciones (T1, *G.c* 300 + *P.l* 3000, cel mL<sup>-1</sup>). Se ha demostrado la toxicidad para los moluscos de distintas especies productoras de toxinas DSP observando una gran variedad de síntomas: cierre de valvas, disminución de la actividad de alimentación para reducir la cantidad de toxina acumulada (Hégaret *et al.*, 2007) o rechazo de la ingestión de las células en forma de pseudoheces (Haberkorn *et al.*, 2011). Se ha demostrado que la producción de pseudoheces es un particular mecanismo preingestivo muy importante, ya que no solo previene que la capacidad ingestiva de los bivalvos sea rebasada, sino que también facilita el proceso de la selección de partículas, en el que las menos nutritivas o peligrosas son rechazadas aumentando con esto la calidad del material que será ingerido (Newell y Jordan, 1983; Urrutia *et al.*, 2001). Estos mecanismos de defensa son muy importantes para evitar daños fisiológicos como la dilatación de túbulos intestinales, el desprendimiento de células del intestino, (Wikfors y Smolowitz, 1995), daños en tejidos, anormalidades en estadios tempranos de desarrollo y cambios en parámetros del sistema inmune en ostras y escalopas (Hégaret y Wikfors, 2005), infiltración de hemocitos en manto, gónada y músculo (Hégaret *et al.*, 2007), y mortalidad (Shumway, 1990). Bauder y Cembella (2000) estudiaron la

viabilidad y el efecto tóxico de *P. lima* sobre *A. irradians*, observando que el dinoflagelado es capaz de sobrevivir y de llevar a cabo división celular tras su paso por el intestino. Ellos identificaron células viables en las heces, lo que podría explicar, en cierta medida, el aumento en el número de células rechazadas en T2 y T3.

La toxicidad de *P. lima* se debe a que produce uno de los más potentes inhibidores naturales de fosfatasa: el ácido okadaico (AO), que es un ácido graso polieter producido por los géneros *Prorocentrum* y *Dynophysis*. En las células, la regulación de la fosforilación de las proteínas es un paso crítico para mantener la homeostasis celular, ya que están involucradas en numerosos procesos biológicos como el metabolismo del glucógeno, la regulación del ciclo celular, la contracción del músculo liso y la síntesis de proteínas entre muchos otros (Maynes *et al.*, 2001). El papel fisiológico de la producción de AO en dinoflagelados no está claro, sin embargo, una de las teorías es el papel de la toxina para disuadir a los depredadores, consumidores de las floraciones de estos dinoflagelados (Dawson y Holmes, 1999). Es paradójico, por el hecho de que se ha demostrado que *P. lima* posee tanto PP-1 y PP-2A que son sensibles a ser inhibidos por el AO (el AO inhibe a la PP-2A de 10 a 100 veces mejor que a la PP-1.), planteando la pregunta de ¿cómo es que el dinoflagelado evita los efectos negativos de la toxina? En diversos experimentos de inmunolocalización con dinoflagelados productores de AO, se ha demostrado que la toxina se localiza en los cloroplastos periféricos y lisosomas, y puede estar asociado con lípidos de la membrana (Zhou y Fritz, 1994) lo que podría ser una de las razones por las que *C. gigas* reconoce a *P. lima* y lo descarta para su alimentación (Landsberg, 2002). En el mejillón *M. edulis* se ha reportado que el AO causa inhibición limitada de la actividad fosfatasa en el tejido digestivo, lo que se ha interpretado como un mecanismo de defensa para sobrevivir al efecto de la toxina DSP (Svensson y Forlin, 1998). De igual forma se ha estudiado la acumulación de toxina tejido-específica en ciertos bivalvos, demostrándose que estos son capaces de autoprotgerse de los efectos de las toxinas DSP producidas por *P. lima* (Bauder *et al.*, 2001). Finalmente, se han sugerido diversos mecanismos enzimáticos, así como la agregación y encapsulación por hemocitos (Galimany *et al.*, 2008), sin embargo, siguen sin conocerse completamente los mecanismos moleculares y metabólicos que utilizan estos

organismos para dicha protección ya que se conoce poco sobre el efecto del AO en organismos marinos (Romero-Geraldo y Hernández-Saavedra, 2012).

## 8.2 Expresión génica

Los eventos FAN ocasionados por especies tóxicas representan un grave problema en los ecosistemas acuáticos, sin embargo, los esfuerzos de investigación se han enfocado al estudio de sus efectos en la salud humana, empleando vertebrados como modelos de estudio para una mejor comprensión de la dinámica de la intoxicación en humanos, mientras que los impactos en moluscos bivalvos ha sido pobremente estudiado (Svensson *et al.*, 2003; Band-Schmidt *et al.*, 2010; Manfrin *et al.*, 2012). La mayoría de los reportes disponibles en la literatura son derivados de estudios sobre los efectos de las ficotoxinas en los moluscos bivalvos, haciendo referencia a los aspectos fisiológicos y en el cambio de respuesta alimentaria, en los cuales se han documentado ampliamente las alteraciones conductuales, fisiológicas e histopatológicas en moluscos ante la ingestión de microalgas tóxicas (Shumway, 1991; Bricelj y Shumway, 1998; Hégaret *et al.*, 2007). Estos estudios, a pesar de no proporcionar datos moleculares absolutos, representan una importante base de conocimientos tanto para una mejor planificación de los experimentos de biología molecular como para la interpretación de los resultados en su contexto biológico (Manfrin *et al.*, 2012). Si bien la falta de estudios moleculares en años anteriores fue causada principalmente por el limitado conocimiento a nivel genético de estos organismos, en la actualidad, *C. gigas* tiene una razonable cantidad de secuencias de ADNc depositadas en el GenBank lo que permite estudiar los estresores ambientales a nivel de expresión genética (Mello *et al.*, 2012).

*C. gigas* está constantemente expuesto a las variaciones naturales del medio ambiente, a patógenos, toxinas y estresores antropogénicos, debido a su naturaleza sésil, enfrenta los cambios del entorno luchando por mantener su homeostasis para sobrevivir (Donaghy *et al.*, 2012). Dependiendo de las condiciones bióticas y abióticas que rodean a los moluscos bivalvos, un estrés metabólico puede ocurrir, caracterizado por la producción de especies reactivas del oxígeno (EROs) (Vargas-Albores y Barracco, 2001). En un organismo, durante los primeros minutos de un proceso de estrés oxidativo, inicia la



respuesta de defensa con la interacción de receptores celulares que no requieren la participación de productos obtenidos mediante activación transcripcional, las primeras respuestas asociadas a inductor-receptor son la alteración del flujo de iones a través de la membrana plasmática, la fosforilación-desfosforilación de proteínas específicas y la formación de EROs (Manduzio *et al.*, 2005). Las EROs juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis en células y tejidos, activando la proliferación celular así como la respuesta inmune e inflamatoria. Actúan como mensajeros secundarios activando la transcripción de genes implicados en procesos de detoxificación y protección de daño celular (Dahlhoff, 2004), participan en la regulación del almacenamiento de glucógeno, la función de los canales iónicos, la detección de oxígeno, la regulación del pH celular, el tráfico intracelular y las capacidades de adhesión de las células (Takahashi y Mori, 2000). Sin embargo, una sobreproducción de EROs también tiene efectos negativos sobre las células en las que interactúan con las proteínas, lípidos y carbohidratos ocasionando daños a través de la peroxidación de lípidos y daños al ADN alterando de forma irreversible la su conformación espacial y su función, lo que conduce a la pérdida de la función celular y, en última instancia, a la apoptosis y necrosis (Di Giulio *et al.*, 1989). El control de estos efectos es llevado a cabo por enzimas antioxidantes o desintoxicantes de las EROs, y juegan un papel importante en la protección celular contra el estrés oxidativo (Downs *et al.*, 2001). Este sistema antioxidante involucra a las denominadas proteínas de estrés (GST, HSP<sub>70</sub>, GS, SOD, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y ascorbato peroxidasa), las cuales han sido usadas para evaluar el estrés oxidativo en distintas clases de organismos, tanto vertebrados como invertebrados incluyendo moluscos bivalvos (Cheng, 1996; Manduzio *et al.*, 2005; Campa-Córdoba *et al.*, 2009; Tran *et al.*, 2010). En consecuencia, el concepto de las EROs como agentes de daño celular ha sido ampliamente aceptado desde hace tiempo (Heininger, 2000; Allen y Burnett, 2008). Moreno *et al.* (2005) demostraron que un proceso de estrés oxidativo tiene curso durante la afectación por toxinas marinas, sin embargo, la información sobre la respuesta molecular (expresión génica) al estrés oxidativo generado por microalgas formadoras de eventos FAN es aún escasa (Romero-Geraldo y Hernández-Saavedra, 2012; García-Lagunas y Hernández-Saavedra, en revisión).

## El efecto de los tratamientos en la expresión génica

Mediante el análisis de los resultados obtenidos, se puede observar que las tasas de expresión alcanzadas en los genes estudiados son afectadas por la concentración de células de los dinoflagelados tóxicos, así como por el tiempo de exposición; estas observaciones coinciden con las reportadas por Romero-Geraldo (2010) y García-Lagunas (2011) en estudios previos.

En tres de los cinco genes (GS, GST y P55) tras los análisis por RT-PCR y estadísticos, los resultados arrojaron un efecto semejante en los tratamientos T2 y T3, en los cuales se suministró una mayor concentración de *P. lima*. Al comparar gráficamente los resultados, se observa una tendencia similar al comportamiento encontrado por Romero-Geraldo y Hernández-Saavedra (2012) en la expresión de *C. gigas* a una exposición individualizada a *P. lima*. Estos resultados sugieren un impacto negativo durante la exposición de *C. gigas* a un evento FAN de *P. lima*, el cual reconoce a esta especie como un agente con un potencial altamente tóxico como lo indican los resultados en el comportamiento en la alimentación. Este dinoflagelado es conocido por producir AO, la toxina se acumula en el sistema digestivo de organismos filtradores y causa intoxicación diarreica (DSP) en humanos (Yasumamoto y Murata, 1993). Se ha estudiado el efecto del OA empleando como modelo mamíferos y ensayos celulares *in vitro*, mientras que se conoce poco sobre la citotoxicidad y el impacto del AO y sus derivados en moluscos bivalvos (Svensson *et al.*, 2003). Esta toxina inhibe la actividad fosfatasa en el proceso de fosforilación en las células eucariotas (Takai *et al.*, 1987; Bialojan y Takai, 1988). Windust *et al.* (1996) señalaron que el AO causa hiperfosforilación de proteínas de una amplia gama de animales y de plantas superiores. Se ha encontrado que AO puede inhibir la síntesis de proteínas y de ADN (Matías *et al.*, 1996). Estudios *in vitro* en células humanas y de rata, han demostrado del potencial genotóxico del AO, concluyendo que esta molécula es capaz de inducir apoptosis. Algunos investigadores han identificado al AO como un potente promotor de cáncer, pues se ha observado que una exposición crónica a estas toxinas estimula la aparición de tumores gastrointestinales (Fujiki y Suganuma, 1993; López-Rodas *et al.*, 2006); en moluscos bivalvos se ha observado el desarrollo anormal del sistema

digestivo en organismos juveniles, así como una inhibición del crecimiento (Wikfors, 2005). Flórez-Barros *et al.* (2011) observaron daño del ADN en el tejido branquial de la almeja *Ruditapes decussates* al exponerla a una concentración de 200 cel mL<sup>-1</sup>, concluyendo que es debido a que este tejido es el primero en estar en contacto con el dinoflagelado tóxico.

Aunque en los resultados en la filtración de *P. lima* por *C. gigas* en T1 se observó que este no fue retenido, en los análisis de expresión de los genes GST, SOD y P55 se observa una alteración en la homeostasis (al alejarse de la línea basal del grupo control), mientras que en el gen HSP<sub>70</sub> el análisis estadístico reveló que los efectos entre los tratamientos T1 y T3 fueron semejantes, sugiriendo entonces que *C. gigas* estuvo expuesto a toxinas o compuestos que *P. lima* excretó en el medio extracelular. Es muy probable que este evento haya ocurrido, especialmente si se considera que Rausch de Traubenberg y Morlaix (1995) estudiaron la presencia de AO en la fase acuosa de los medios de cultivos de *P. lima*. Estos autores observaron que el medio extracelular contenía de 19 a 29 % de AO, lo que atribuyeron a su solubilidad parcial en agua dada por las funciones hidrofílicas de la molécula de AO (1 función carboxílico, 4 funciones hidroxilo). Una de las hipótesis que plantearon fue que esta solubilización parcial podría suceder durante la mitosis como resultado de la división celular, pues las células madre liberan toxinas al mismo tiempo que las células hijas son liberadas. Otra hipótesis es que las células seniles se lisan y como resultado lanzan toxinas en el medio de cultivo. Matus-Hernández (2013) encontró cambios en el proteoma de *C. gigas* como resultado de su exposición a extractos acuosos de *P. lima*, *P. rhathymum* y *P. minimum*, que considerando los hallazgos de Rausch de Traubenberg y Morlaix (1995) podrían explicarse con la misma base, en términos de la solubilización parcial del AO.

### **Sobre la respuesta génica**

#### **GS**

La enzima glutamina sintetasa (GS) desempeña funciones fundamentales como la fijación de amonio y la biosíntesis de glutamina ATP-dependiente a partir de amonio y glutamato, la cual tiene un papel central en el metabolismo del nitrógeno celular,

desintoxica amonio y transfiere nitrógeno residual (producto del metabolismo a urea) para eliminar el amonio de algunos tejidos, operando de forma constitutiva pero también inducible (Romero-Geraldo y Hernández-Saavedra, 2012). GS también juega un papel en el sistema nervioso central en el reciclaje de los neurotransmisores de glutamato (Murray *et al.*, 2003).

En este estudio, se encontró que en *C. gigas* la exposición a ambos dinoflagelados no tiene un fuerte efecto sobre la transcripción de este gen, ya que su expresión no mostró variaciones importantes dosis-tiempo dependiente de los tratamientos comparados con el grupo control, durante las primeras 24 h de exposición. Sin embargo, a las 72 h se refleja una represión de la expresión ante la presencia de las especies tóxicas, lo cual nos podría indicar de que los juveniles de *C. gigas* estuvieron en condiciones de estrés presentando una desregulación en el metabolismo de eliminación de amoníaco que pudo generar citotoxicidad y la pérdida de la homeostasis celular, lo que fue más evidente en T2 y T3 con mayor número de células de *P. lima*, tal y como lo observó Romero-Geraldo (2010). Esta pérdida en la modulación de GS coincide con lo observado por Romero-Geraldo y Hernández-Saavedra, (2012) y García-Lagunas y Hernández-Saavedra (datos no publicados), cuyos resultados revelaron una desregulación de la expresión de GS a partir de las 6 h de exposición individualizada de *P. lima* y *G. catenatum*, sobre todo en los tratamientos de mayor concentración de microalgas. Se sabe que la excreción de nitratos se incrementa en organismos expuestos a dinoflagelados tóxicos, se piensa que este efecto se debe probablemente al metabolismo, transformación y eliminación de las toxinas que se acumulan en los diferentes tejidos (Lassus *et al.*, 2004). Un efecto de sobre-expresión de GS se ha encontrado en *C. gigas* expuesto a diferentes factores estresantes como hidrocarburos (Boutet *et al.*, 2004), herbicidas (Tanguy *et al.*, 2005), condiciones de hipoxia (David *et al.*, 2005) y temperaturas elevadas (Meistertzheim, 2007).

## **GST**

La familia de las enzimas glutatión-S-transferasa (GST) es uno de los mayores grupos de isoenzimas destoxificantes, altamente conservados e implicados en el metabolismo de muchos xenobióticos. El amplio rango de de sustratos de la GST permite

proteger a la célula mediante la conjugación de la glutatión (GSH) a sustratos electrofílicos, generando compuestos menos reactivos y más solubles que pueden ser fácilmente eliminados de la célula a través de transportadores de membrana específicos (Castillo-Cadena, 2007).

La presente investigación demostró que ante un agente tóxico, en este caso dinoflagelados productores de toxinas marinas de diversa naturaleza química, el organismo responde generando una modulación significativa en la transcripción del gen GST tal como se muestra en los grupos expuestos en diferentes tratamientos en comparación con el control. En los tres tratamientos se observó una represión en la expresión del gen GST a las 3, 6 y 12 h, lo cual puede indicar que *C. gigas* estuvo expuesto a sustancias potencialmente tóxicas, tal como lo indican Ringwood y Connors, (2000), cuando asocian el decremento de GST con el incremento de la toxicidad por metales pesados. El aumento de la expresión en los tiempos de muestreo restantes puede interpretarse como una respuesta compensatoria a través de la expresión de GST dada por la situación de estrés generada (Romero-Geraldo y Hernández-Saavedra, 2012). Se observa que a las 72 h de exposición la modulación de la expresión de GST en los tres tratamientos alcanza el estado basal del grupo control, lo que es indicativo de un equilibrio en la detoxificación de las toxinas producidas por los dinoflagelados tóxicos, ya que en las adaptaciones bioquímicas que involucran genes de respuesta a xenobióticos, GST puede explicar en parte la resistencia de los organismos a las amenazas químicas alimentarias (Whalen *et al.*, 2008; Tomanek, 2011). Es bien conocida la producción de sustancias aleloquímicas por microalgas y cianobacterias, entre las que se incluyen las toxinas, por lo que el papel de la GST en la alimentación toma un lugar muy importante, ya que se une con enlaces no covalentes a diversas sustancias xenobióticas hidrófobas y endógenas, además de participar en su aislamiento y transporte seguido por desactivación y excreción (Kulinsky y Kolesnichenko, 1990).

La presencia de glutatión en los moluscos bivalvos promueve reacciones de conjugación y juega un papel importante durante el proceso de desintoxicación, por ello es un biomarcador utilizado en algunos estudios de biomonitoreo. Se ha observado que GST participa de forma activa en la eliminación de hidrocarburos y pesticidas, que muestra una

fuerte expresión diferencial tejido-específica, relacionada con el tiempo de exposición y el tratamiento (Boutet *et al.*, 2004).

## SOD

La función de la enzima SOD consiste en eliminar el radical superóxido (Geret *et al.*, 2003), este metabolito intermediario es el resultado de numerosas reacciones enzimáticas, oxidación de compuestos de importancia biológica, así como de la cadena de transporte electrónico de la mitocondria en el metabolismo de organismos aerobios (Yu *et al.*, 2011). El radical superóxido es poco reactivo, con un tiempo de vida media de milisegundos a valores de pH fisiológicos, sin embargo, puede reaccionar consigo mismo produciendo peróxido de hidrógeno que a su vez reacciona con otro radical superóxido produciendo a través de la reacción de Haber-Weiss el radical hidroxilo, esta reacción es catalizada por metales de transición como el hierro y el cobre. El radical hidroxilo (\*OH) se encuentra entre los oxidantes más potentes que se conocen (Koppenol, 2001), puede atacar prácticamente a todas las moléculas presentes en la célula (puede hidrolizar las bases púricas y pirimidínicas del ADN, dando lugar a mutaciones). El radical superóxido y los productos más tóxicos que derivan de éste, pueden iniciar una serie de reacciones que pueden conducir a daños celulares tan importantes como el ataque al ADN, membranas lipídicas y otros componentes celulares esenciales, por lo tanto, aunque el radical superóxido por sí mismo no sea tan tóxico, puede generar otros radicales que son más peligrosos aún (De La Torre, 1994).

El estudio de la SOD en bivalvos ha proporcionado información muy importante para entender la fisiología de estos organismos, por ejemplo, se ha observado que una baja tasa metabólica y altos niveles de la enzima SOD a través de la historia de vida en la almeja *Arctica islandica* pueden explicar su extraordinaria longevidad de hasta 400 años (Abele *et al.*, 2008). En general, se ha observado que en bivalvos y aves el estrés oxidativo y la longevidad están inversamente relacionados cuando existe una relación desigual de ambos factores (Buttermer *et al.*, 2010).

En este trabajo, se observó que la expresión del gen SOD fue muy alta a partir de las 6 h, presentando en general un pico máximo a las 12 h para disminuir hasta niveles basales

(TC2) a las 72 h, lo que indica que los juveniles de *C. gigas* fueron capaces de mantener su homeostasis. Estos resultados coinciden con los encontrados por Campa-Cordoba *et al.* (2009), al observar que en juveniles de *L. vannamei* y *N. subnodosus* expuestos a 5 000 cel mL<sup>-1</sup> de *P. lima* la actividad enzimática relativa de SOD se presentó durante las primeras 6 horas de exposición. Samain *et al.* (2007) observaron en dos grupos de segunda y tercera generación de *C. gigas* (proveniente de padres a las que se les denominó resistentes (R) y el otro grupo denominado susceptibles (S) a la muerte estival), que el grupo R que tuvo menor frecuencia de muerte presentó altas actividades de SOD y catalasa. En el grupo S se observó una alta actividad de HSP<sub>70</sub>, sugiriendo que los genes con mayor actividad y más expresados en R son los involucrados en los procesos de desintoxicación, y que en el grupo S se presentó una deficiencia en la regulación del estrés oxidativo.

### **HSP<sub>70</sub>**

HSP<sub>70</sub> es una proteína de choque térmico que se produce y reacciona rápidamente en las células vivas como respuesta a los estímulos de estrés, son chaperonas moleculares ya que participan en el plegamiento de proteínas, ensamblaje, degradación y localización intracelular, además, se activan y se inducen como respuesta a algunos agentes tóxicos como mecanismo preventivo y de reparación de daños (Haslbeck, 2002). Esta proteína se expresa constitutivamente en las células, por lo que es un gen constitutivo e inducible (Franzellitti y Fabbri, 2005).

Diferentes sustancias químicas afectan directa o indirectamente a las proteínas celulares, por la oxidación de los grupos tiol y los puentes disulfuro, desestabilizando su estructura (Farcy *et al.*, 2007). La HSP<sub>70</sub> juega un rol primario en la resistencia a una variedad de agentes tóxicos y situaciones fisicoquímicas que no necesariamente involucran desnaturalización de proteínas (Beere y Green, 2001). Debido a la gran diversidad de factores tóxicos, se puede plantear la hipótesis de que la respuesta de HSP<sub>70</sub> se desencadena por múltiples mecanismos, sin embargo, la pérdida de la conformación proteica se mantiene por el momento como el único factor común a nivel celular; esto ocurre en el caso de la exposición a metales pesados, radicales libres y pesticidas (Fabbri *et al.*, 2008). La HSP<sub>70</sub> desempeña un papel importante en la estrategia de supervivencia de los moluscos

durante sus etapas tempranas de vida. Dado que los medios acuáticos son altamente dinámicos, los moluscos pueden estar sujetos a una variedad de fuentes de estrés, por lo que la HSP<sub>70</sub> podría participar en la adaptación de estos organismos a una amplia gama de problemas ambientales (Cruz-Rodríguez *et al.*, 2000).

En este trabajo, el comportamiento global de la transcripción del gen HSP<sub>70</sub> ante una combinación de dinoflagelados tóxicos de fue de represión, probablemente debido a un decremento en la capacidad metabólica de los organismos o al estrés oxidativo generado (Choi *et al.*, 2008), situación que induce otros genes de respuesta a estrés ya que la respuesta de HSP<sub>70</sub> es conservada evolutivamente y se desarrolla en minutos, que con su sobreexpresión conduce a la activación de la transducción de las principales vías de señalización (Dorion *et al.*, 1999). En un experimento realizado por Samain *et al.* (2007), se seleccionaron organismos de *C. gigas* resistentes (R) y susceptibles (S) a la muerte de verano, encontrándose diferentes tasas de expresión de HSP<sub>70</sub> después de 8 días de aclimatación. En organismos R se encontró represión, mientras que en los S se registró sobreexpresión antes de morir, sugiriendo con esto que organismos S sufrieron de estrés oxidativo como resultado de la respiración mitocondrial, la deficiencia de la producción de SOD/catalasa, así como del alto costo energético ya que HSP<sub>70</sub> requiere ATP (Fabbri *et al.*, 2008). En este trabajo se observó un bajo nivel de expresión de HSP<sub>70</sub> y sobreexpresión de SOD, lo que sugiere que *C. gigas* alcanzó el equilibrio entre las EROs producidas por el estrés a las 72 h, cuando la expresión de los tres tratamientos alcanzó el nivel basal de la expresión génica (grupo control) lo que coincide con lo observado en los organismos R del experimento realizado por Samain *et al.* (2007).

La proteína de estrés HSP<sub>70</sub> es un biomarcador que se presenta en concentraciones elevadas en bivalvos expuestos a metales pesados y a hidrocarburos aromáticos (Cruz-Rodríguez y Chu, 2002). Estos resultados se han utilizado junto con otros biomarcadores para evaluar la salud de moluscos (Werner *et al.*, 2004). Sin embargo, su uso como biomarcador debe basarse en estudios previos sobre las características bioquímicas y fisiológicas de los animales analizados, ya que la HSP<sub>70</sub> se expresa diferencialmente en los tejidos del mismo organismo, además de que está sujeta a variaciones estacionales y



fisiológicos relacionados con la disponibilidad de oxígeno, temperatura y salinidad (Minier *et al.*, 2000; Bodin *et al.*, 2004; Hamer *et al.*, 2004).

## **P55**

La elección del uso de la expresión de este gen (involucrado en la regulación de ácidos nucleicos) se debe a la naturaleza química de una de las toxinas producidas por las especies de prueba contra *C. gigas*. *P. lima* produce AO, que tiene efectos genotóxicos que incluyen ruptura de la doble cadena de ADN (Traore *et al.*, 2001), daño y alteraciones en la reparación de ADN (Valdiglesias *et al.*, 2010), aductos de ADN (Fessard *et al.*, 1996), apoptosis (Valdiglesias *et al.*, 2011), alteraciones en el huso mitótico (Van Dolah y Ramsdell, 1992) y formación de micronúcleos (Hegarar *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2006). Para poder comprender el efecto dañino del AO en el material hereditario, es importante recordar que el ADN está asociado con proteínas dentro del núcleo eucariota formando un complejo conocido como cromatina (Van Holde, 1988). La subunidad fundamental del cromosoma, el nucleosoma, consiste de aproximadamente 146 pb de ADN enrollados alrededor de un núcleo de proteínas compuesto por ocho histonas (Zlatanova *et al.*, 2009).

La cromatina debe alterar su conformación para contrarrestar los efectos genotóxicos del AO, mediando la activación de una variedad de mecanismos involucrados en el mantenimiento de la integridad del genoma, siendo los más importantes la transcripción, la replicación, la recombinación y la reparación del ADN (Moggs y Orphanides, 2004). Este proceso de alteración de la cromatina llamado remodelación de cromatina requiere de la acción de enzimas modificadoras de histonas, del complejo remodelador de la cromatina ATP-dependiente y de variantes de histonas con funciones especializadas (Ausió, 2006). Por ejemplo, se ha demostrado que la fosforilación en combinación con otras modificaciones post-traduccionales como la acetilación (Bird *et al.*, 2002; Tamburini y Tyler, 2005) pueden funcionar como señales de reconocimiento para diferentes complejos de proteínas involucradas en la reparación del ADN (Houben *et al.*, 2007). La proteína P55 actúa en la acetilación de histonas por lo podría estar involucrada en la reparación del ADN afectado por AO.

En los moluscos bivalvos existe poca información sobre los factores asociados a la cromatina, mecanismos de reparación y variantes de histonas, lo cual dificulta el acceso a su estructura y procesos metabólicos en estos organismos y su aplicación en los estudios de genotoxicidad. Sin embargo, librerías de expresión de mejillones expuestos a AO revelaron que la expresión del gen que codifica a la histona H2A.Z de los mejillones fue reprimida debido a la exposición de los moluscos a concentraciones dañinas de AO señalando su participación en el mantenimiento de la integridad genómica como respuesta a esta biotoxina (González-Romero *et al.*, 2012). Además, se ha demostrado que el AO causa una reducción significativa en la reparación del ADN, la viabilidad celular (Chowdhury *et al.*, 2005) y defectos en los puntos críticos de control de la división celular (Carlessi *et al.*, 2010).

En este trabajo se observó que los efectos se reflejan mayormente en los tratamientos con mayor concentración de *P. lima* que es uno de los mayores productores de AO. En T1 se observó un pico máximo de expresión a las 6 h de exposición, después de la expresión de este gen fue cercano al nivel basal (TC2), lo que podría indicar que la maquinaria de reparación del daño al ADN fue eficiente ya que se observó que a las 72 h (exposición sub-crónica) la expresión se mantuvo en niveles basales. Para T2 y T3 la tendencia global fue de represión de la expresión, siendo más evidente en T2, donde el ostión consumió cantidades similares de ambos dinoflagelados en las primeras 6 h pero, como se describió en el análisis del comportamiento de alimentación, en T3 hubo mayor rechazo y presencia de pseudoheces, lo que puede interpretarse como que en ambos tratamientos se había mayor concentración de toxinas que en T1, sugiriendo la participación de P55 en el mantenimiento de la integridad genómica.

### **Sobre del efecto de la combinación.**

A menudo, las combinaciones de sustancias tóxicas originan efectos diferentes de los que se hubiera predicho para las mismas sustancias de manera independiente (Capo, 2007). Lamentablemente, se desconoce la naturaleza de muchas interacciones, tal es el caso del nulo conocimiento de los efectos de la exposición de *C. gigas* a una combinación de organismos productores de toxinas marinas (PSP+DSP) formando una mezcla compleja,

en la cual los compuestos tóxicos pueden interactuar generando sinergismo o por suma, generándose una potenciación, o bien de forma antagónica, la que se traduce en una disminución o cancelación total de efecto (Vásquez, 2005; Repetto, 2009). En este estudio la respuesta generada por la exposición a la combinación de dinoflagelados tóxicos en los genes GS, GST, HSP<sub>70</sub> fue antagónica, y en el único caso donde presentó una respuesta donde se evidencia una sobremodulación de la respuesta ante estos estresores fue en el gen SOD.

La medición de SOD ha sido aceptada como un método exacto para cuantificar la actividad antioxidante, el cual juega un papel muy importante en la modulación de la respuesta oxidativa (Estrada *et al.*, 2007a). Al realizar el análisis de expresión del efecto combinado de la exposición de *C. gigas* a una combinación de dos especies de dinoflagelados tóxicos y contrastar la respuesta en el gen SOD con los estudios previos realizados en el grupo de genética molecular del CIBNOR (mediante RT-PCR), se pudo observar que este gen tuvo un comportamiento muy interesante, pues es el único de los 5 genes analizados en el que se observó un comportamiento sinérgico en la tasa de expresión, al rebasar las tasas encontradas ante una exposición individualizada. En conjunto SOD y catalasa son dos enzimas muy importantes en el sistema antioxidante de los organismos. Diversos estudios han mostrado una correlación positiva entre los niveles de esta enzimas y la influencia de las condiciones ambientales, lo cual sugiere que existe un equilibrio entre oxidantes y antioxidantes (Orbea *et al.*, 2002).

El antagonismo observado pudo deberse a factores como la modificación en el comportamiento de la filtración (disminución de consumo) ó a la modulación génica generada por los dinoflagelados. En el comportamiento de la alimentación se observó una disminución en la filtración de *P. lima*, lo que coincide con otros estudios realizados, donde en *O. edulis* una combinación de Cd y Zn indujo una expresión menor en HSP<sub>70</sub>, que el efecto observado por la exposición a Cd de manera individual. Según Blackmore y Wang (2002), podría deberse a una disminución de la tasa de filtración por los organismos, o por la competencia de los agentes tóxicos por los sitios de ingreso y absorción en las células. Aune *et al.* (2012) encontraron que al exponer a ratones a una combinación de una dosis DL<sub>50</sub> de AO y azaspiracida administrada vía oral, disminuyó considerablemente el grado de

absorción de las dos toxinas, lo cual asumieron que se debió a la competencias a ingresar a las células del tracto intestinal por difusión simple (debido a las características moleculares de las toxinas) reduciendo la mortalidad. Aasen *et al.* (2011) administraron extracto de yesotoxina de moluscos bivalvos contaminados y evaluaron el aumento de toxicidad al combinarse con azaspiracida, encontrando nulo efecto clínico en ratones.

En cuanto a la modulación génica producida por los dinoflagelados, en general *G. catenatum* causa una sobre-regulación en la expresión de la mayoría de los genes analizados, mientras que al parecer *P. lima* produce un efecto contrario. Se ha documentado que cuando los hemocitos son incubados con microalgas dañinas se pueden producir dos tipos de respuesta: 1) algunas microalgas pueden actuar como inmunoestimulantes activando los hemocitos como en el caso de *P. minimum* en almeja dura (Wikfors y Smolowitz, 1993), almeja manila (Hégaret *et al.*, 2009), mejillones (Galimany *et al.*, 2008) y escalopas (Hégaret y Wikfors, 2005), o en el caso de *A. minutum* en *C. gigas* (Haberkorn *et al.*, 2010a). 2) otras pueden causar una supresión de las funciones inmunes que consisten generalmente en la disminución de la fagocitosis como en la almeja dura y almeja de concha blanda expuestos *in vitro* a *A. fundyense*; disminución de la adhesión celular como en el caso de la almeja dura expuesta *in vitro* a *A. minutum* y menor producción de ROS (Hégaret *et al.*, 2011). Los resultados de Hégaret *et al.* (2011) muestran que los hemocitos responden a las FAN de una manera especie-específica, pero que las especies FAN frecuentemente causan un perfil consistente de inmunomodulación en la mayoría de las especies de bivalvos debido a la producción y secreción de sustancias químicas.

### **Análisis de expresión en tiempo real**

Al comparar gráficamente los resultados obtenidos por RT-PCR y qPCR para GS se observa en T1 un comportamiento similar entre ambos métodos, en el cual la expresión encontrada se aleja poco de TC2 a lo largo de las 72 h. De igual forma el efecto es semejante entre T1 a TC2, de acuerdo al análisis estadístico, lo que se refleja en los efectos significativos en T2 y T3 donde se suministró como alimento una mayor concentración de células. No obstante, en T2 el comportamiento observado en qPCR fue de represión a lo largo de las 72 h, reflejándose de forma más evidente por RT-PCR (a las 72 h), donde

ambos métodos coinciden en la respuesta a una exposición subcrónica a las microalgas tóxicas. En T3 se observó un pico máximo de expresión a las 12 h por qPCR, así como sobreexpresión a las 72 h (en qPCR), mientras que mediante RT-PCR el efecto observado fue de represión, señalando nuevamente una desregulación del metabolismo del amonio generado ante el estrés generado por la presencia de las ficotoxinas en T2 y T3, como se menciona en la sección correspondiente a la discusión de este gen.

En los resultados obtenidos por ambos métodos para GST, se observa una tendencia de la expresión de T1 a mantenerse cercano a los valores basales durante los primeros tiempos de muestreo (0, 3, 6 h); coincidiendo además en T1 en términos de sobreexpresión y represión en los diferentes tiempos de muestreo a lo largo de 72 h. En el caso de T2, el comportamiento observado fue contrario entre los dos métodos, pero sin alejarse de la línea basal. En T3 se observa el mismo patrón entre los dos métodos hasta las 24 h, observándose un desempeño contrario a las 72 h al igual que T2. De manera global, al paso del tiempo (72 h) se observa la capacidad de los juveniles de *C. gigas* a mantener la homeostasis a través de la modulación de este gen para contrarrestar los efectos adversos de las sustancias tóxicas presentes en el alimento suministrado, tal como se discute en la sección correspondiente.

Para el gen SOD los resultados de la expresión es contrario entre ambos métodos, ya que en RT-PCR la tendencia observada fue sobreexpresión durante las primeras 24 h, mientras que para qPCR fue de represión a lo largo de las 72 h analizadas, al cabo del cual se observó la capacidad de *C. gigas* de alcanzar nuevamente la expresión observada en T2, lo cual sugiere una respuesta adaptativa de *C. gigas* a las condiciones generadas por los dinoflagelados tóxicos. *C. gigas* llegó a este nivel de adaptación al modificar su comportamiento alimentario seleccionando y rechazando el alimento, lo que se respalda con el hecho de no haberse presentado mortalidad en ningún tratamiento a lo largo del bioensayo completo.

En HSP<sub>70</sub> se observa una tendencia a la represión de la expresión para T1 la cual coincide en ambos métodos. En T2 y T3 se observa un comportamiento contrario en ambos métodos a las 3, 6 y 12 h: represión en RT-PCR y sobreexpresión en qPCR. Cabe señalar que ambos análisis arrojan que a las 24 y 72 h para T2 y T3 la tendencia de la expresión es

de acercarse a la línea basal. Estos resultados y los observados en SOD sugieren que el sistema antioxidante de los juveniles de *C. gigas* contrarrestó de manera exitosa los efectos adversos provocados por los dinoflagelados tóxicos.

Para P55 en T1 se observa el mismo patrón de comportamiento a las 3, 6 h (presentando el pico máximo de expresión en ambos métodos) a las 12 h un comportamiento contrario para posteriormente a las 24 y 72 h sobre-expresarse. Para T2 se observa una tendencia a la represión en la expresión en el análisis por RT-PCR, mientras que en qPCR una tendencia a la sobreexpresión, coincidiendo a las 72 h. En T3 en los puntos de muestreo donde coincide el comportamiento es a las 3, 24 y 72 h, mientras que en los restantes se presenta un comportamiento contrario. En qPCR queda reflejado el fuerte efecto genotóxico de *P. lima*, sustentando esta afirmación con el hecho de que en los tres tratamientos se presentaron diferencias significativas con respecto al grupo control, pero siendo más fuerte en T2 y T3 al observar gráficamente los resultados. Se discute en el apartado correspondiente a este gen el carácter tóxico de AO.

## 9. Conclusiones

- Debido a su carácter de organismo filtrador selectivo en su proceso de alimentación *C. gigas* seleccionó a *G. catenatum* en una mezcla de dinoflagelados tóxicos, rechazando a *P. lima* en forma de pseudoheces.
- *G. catenatum* podría formar parte de la dieta de *C. gigas* hasta ciertas concentraciones, debido a su alta calidad nutritiva y a la tolerancia intermedia del ostión japonés a las toxinas PSP.
- Los genes analizados están involucrados en la síntesis de proteínas de respuesta a estrés y desintoxicación celular, los cuales son la primera línea de defensa celular de *C. gigas* para mantener su homeostasis.
- En *C. gigas* no se observa una relación proporcional en la expresión de los genes evaluados entre los distintos tratamientos, sin embargo, fue posible observar una interacción tiempo-tratamiento estadísticamente significativa.
- La homeostasis del ostión japonés fue alterada ante la presencia de *P. lima* y *G. catenatum*, principalmente en la exposición aguda, lo que podría aumentar la susceptibilidad a distintos agentes potencialmente dañinos antes de alcanzar el equilibrio entre el sistema antioxidante y los agentes estresores.
- En los genes GS, GST y P55, los efectos dosis-dependientes fueron significativamente diferentes al control, sin embargo, en los tratamientos T2 y T3 donde se encontraba en mayor concentración *P. lima* estos fueron semejantes entre sí, lo cual puede deberse a que se ha establecido que el AO inhibe a las PP1 y PP2A que participan en numerosos procesos celulares de células eucariotas.
- En los genes GS, GST, HSP70 y P55 se observó un efecto antagónico de la expresión génica después de la exposición a una combinación de dinoflagelados tóxicos productores de toxinas DSP y PSP, probablemente debida a factores como la modificación en el comportamiento de la filtración (disminución de consumo) o a la modulación génica generada por los dinoflagelados.
- En el gen SOD se presentó un efecto sinérgico, debido a la característica del gen, es constitutivo pero inducible ante distintos estresores, lo cual sugiere que ambos

dinoflagelados provocaron en *C. gigas* un estrés severo en las primeras horas de la exposición.

- En general, se observó una respuesta de modulación en todos los genes analizados en la fase aguda (24 h), sin embargo, en la fase subcrónica se observó que la expresión de estos genes se acercó a la línea basal del tratamiento control, lo cual puede sugerir que un efecto adaptativo ante estos estresores fue generado por *C. gigas* para mantener su homeostasis.



## 10. Bibliografía

- Aasen J. A. B., Espenes A., Miles C. O., Samdal I. A., Hess P., Aune T. 2011. Combined oral toxicity of azaspiracid-1 and yessotoxin in female NMRI mice. *Toxicon*, 56: 1419-1425.
- Abele D., Strahl J., Brey T., Philipp E. E. R. 2008. Imperceptible senescence: Ageing in the ocean quahog *Arctica islandica*. *Free Radical Research*. Vol. 42, No. 5 : Pages 474-480
- Allen S. M., Burnett L. E. 2008. The effects of intertidal air exposure on the respiratory physiology and the killing activity of hemocytes in the pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *J Exp Mar Biol Ecol* 357: 165–171.
- Almeida M.J. and Manchado J. 1997. Growth and biochemical composition of *Crassostrea gigas* (Thunberg) at three fishfarm earthen ponds. *Oceanographic Literature Review*. 45: 1694-1695.
- Alonso-Rodríguez R., Páez-Osuna F. y Gárate-Lizárraga I. 2004. Mareas rojas y biotoxinas en la camaronicultura. Laboratorio de Biotoxinas. Unidad Académica Mazatlán, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp. 147.
- Álvarez-Cárdenas J. 2009. Efecto de la exposición de semillas del ostión japonés *Crassostrea gigas* a organismos productores de toxinas DSP, en genes relacionados con la regulación proteica y el metabolismo energético celular. Documento de Residencias profesionales. Instituto Tecnológico de la Paz. Pp 87.
- Anderson D.M. 2007. The ecology and oceanography of harmful algal blooms, multidisciplinary approaches to research and managemet. Anton Bruun Memorial Lecture. UNESCO.

Asakawa M., Meppu R., Tsubota M., Ito K., Takayama H., Miyazawa K. 2005. Paralytic Shellfish poison (PSP) profiles and toxification of short-necked clams fed with the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *J Food Hyg Soc Jpn.* 46:251-255.

Aune T., Espenes A., Aesen B. J., Quilliam A. M., Hess Phillip Hess., Larsen S. 2012. Study of possible combined toxic effects of azaspiracid-1 and okadaic acid in mice via the oral route. *Toxicon*, 60: 895–906

Ausió J., 2006. Histone variants: the structure behind the function. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* 5, 228–243.

Band-Schmidt C.J., Bustillo-Guzmán J., Gárate-Lizárraga I., Lechuga-Devéze C.H., Reinhart K., Luckas B. 2005. Paralytic shellfish toxin profile in strains of dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham and the Scallop *Argopecten ventricosus* G-B. Sowerby II from Bahia Concepción. Gulf of California. México Harmful Algae. 4 21- 31.

Band-Schmidt C. J., Bustillos-Guzmán J. J., López-Cortes D. J., Garate-Lizárraga I., Núñez-Vázquez E. J., Hernández-Sandoval F. E. 2010. Ecological and Physiological Studies of *Gymnodinium catenatum* in the Mexican Pacific: A review. *Mar. Drugs.* 8. 1935-1961.

Band-Schmidt C., Bustillos-Guzmán J. J., Morquecho-Escamilla L., Gárate-Lizárraga I., Alonso-Rodríguez R., Reyes-Salinas A., Erler K., Luckas B. 2006. Variations of PSP toxin profiles during different growth phases in *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) strains isolated from three locations in the Gulf of California, Mexico. *Journal of Phycology* 42: 757–768.

Band-Schmidt C.J. 2003. Ciclo de vida, crecimiento y toxicidad de los dinoflagelados tóxicos *Alexandrium affine* y *Gymnodinium catenatum*. Tesis de doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz Baja California Sur. pp 2-4

- Bauder A. and Cembella A.D. 2000. Viability of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* following ingestion and gut passage in the bay scallop *Argopecten irradians*. *Journal of Shellfish Research*, 19: 321-324.
- Bauder A.G., Cembella A.D., Bricelj V.M., Quilliam, M.A. 2001. Uptake and fate of diarrhetic shellfish poisoning toxins from the dinoflagellate *Prorocentrum lima* in the bay scallop *Argopecten irradians*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 213: 39-52.
- Beere H. M. and Green DR. 2001. Stress management - heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 11: 6-10.
- Bialojan C. and Takai A. 1988. Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem J.* 1988 Nov 15;256(1):283-90.
- Bird A.W., Yu D.Y., Pray-Grant M.G., Qiu Q., Harmon K.E., Megee P.C., Grant P.A., Smith M.M., Christman M.F. 2002. Acetylation of histone H4 by Esa1 is required for DNA double-strand break repair. *Nature* 419, 411–415.
- Blackmore G. and Wang WX., 2002. Uptake and efflux of Cd and Zn by the green mussel *Perna viridis* after metal preexposure. *Environ. Sci. Technol.* 36: 989-995,
- Blanco J. and Campos M.J. 1988. The effect of water conditioned by a PSP-producing dinoflagellate on the growth of four algal species used as food for invertebrates. *Aquaculture*, 68: 289-298.
- Blanco J., Franco J.M., Reyero M.I., Morono A. 1997. PSP detoxification kinetics in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. One- and two-compartment models and the effect of some environmental variables. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 158: 165-175.
- Bodin N., Burgeot T., Stanisiere J. Y., Bocquene G., Menard D., Minier C. 2004. Seasonal variations of a battery of biomarkers and physiological indices for the mussel *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the northwest Mediterranean Sea. *Comp. Biochem. Physiol.* 138C: 411-427.

- Bougrier S., Hawkins A., Héral M. 1997. Pre-ingestive selection off different microalgal mixtures in *Crassostrea gigas* and *Mytilusedulis*, analyzed by flow cytometry. *Aquaculture* 150, 123-134.
- Boutet I., Tanguy A., Moraga D. 2004. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene* 329: 147-157.
- Bricelj V.M., Lee J. H., Cembella A. D. 1991. Influence of dinoflagellate cell toxicity on uptake and loss of paralytic shellfish toxins in the northern quahog *Mercenaria mercenaria*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 74: 33–46.
- Bricelj M. V., Ford E. S., Borrero J. F., Perkins F. I., Rivara G., Hillman E. R., Elston A. R., Chang J. E. 1992. Unexplained mortalities of hatchery-reared, juvenile oysters, *crassostrea virginica* (gmelin). *J. Shell.Res.*, 11(2): 331-347.
- Bricelj, V.M., Cembella A.D., Laby D., Shumway S.E., Cucci, T.L. 1996. Comparative physiological and behavioral responses to PSP toxins in two bivalve mollusks, the softshell clam, *Mya arenaria* and surfclam, *Spisula solidissima*. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y. (Eds.), Harmful and Toxic Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp. 405–408.
- Bricelj V. M. and Shumway S. E., 1998. Paralytic shellfish toxins in bivalve mollusks: occurrence, transfer kinetics, and biotransformation. *Rev. Fish. Sci.*, 6: 315–383.
- Brillant M. G. S., MacDonald B.A. 2000. Postingestive selection in the sea scallop, *Placopecten magellanicus* (Gmelin): the role of particle size and density. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 253; 211–227.
- Campa-Córdova A. I., Núñez-Vázquez E. J., Luna-González A., Romero-Geraldo M. J., Ascencio F. 2009. Superoxide dismutase activity in juvenile *Litopenaeus vannamei* and *Nodipecten subnodosus* exposed to the toxin dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 149: 317-322.

- Capo M. A. 2007. Toxicología Ambiental. 1ª Edición, Ed. Diana, México, 320 p.
- Carlessi L., Buscemi G., Fontanella E., Delia D. 2010. A protein phosphatase feedback mechanism regulates the basal phosphorylation of Chk2 kinase in the absence of DNA damage. *Biochim. Biophys. Acta* 1803, 1213–1223.
- Carvalho P.S., Catian R., Moukha S., Matias W.G., Creppy E.E. 2006. Comparative study of domoic acid and okadaic acid induced-chromosomal abnormalities in the Caco-2 cell line. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 3, 4–10.
- Castillo-Cadena J., Contreras-Gómez S., Poblano-Bata R., Posadas-González R., Ramírez-García J.J. 2007. Actividad de la enzima glutatión S-Transferasa T1 en floricultores expuestos a plaguicidas. *Bioquímica*. 32 (SA) 138 p.
- Cheng T. 1996. Hemocytes: forms and functions. In *The Eastern Oyster Crassostrea virginica* (ed. R. I. E. Newel, V. S. Kennedy and A. F. Eble), pp. 299-334. College Park, MD: Maryland Sea Grant College
- Choi Y. K., Jo P. G., Choi C. Y. 2008. Cadmium affects the expression of heat shock protein 90 and metallothionein mRNA in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol.* 147C: 286-292.
- Chomczynski P. and Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162: 156.
- Chowdhury, D., Keogh, M.C., Ishii, H., Peterson, C.L., Buratowski, S., Lieberman, J., 2005. Gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA doublestrand break repair. *Mol. Cell*. 20, 801–809.
- Clément, A. and G. Lembeye. 1994. Floraciones de Algas Nocivas en Chile: Manejo y perspectivas futuras. *En: IOC Workshop Rep.* 101: 20-29.

Comisión Federal Para la Protección contra Riesgos Sanitarios. México. *Presencia de marea roja en costas nacionales durante 2010*. Antecedentes en México. Archivo en línea.

Cognie B., Barille´ L., Rince´ Y. 2001. Selective feeding of the oyster *Crassostrea gigas* fed on a natural microphytobenthos assemblage. *Estuaries* 24, 126–134.

Cognie B., Haure J., Barrillé L. 2006. Spatial distribution in a temperatura coastal ecosystem of the wild stock of the farmed oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1873). *Aquaculture*, 259:249-259.

Colin S.P. and Dam H.G. 2002a. Latitudinal differentiation in the effects of the toxic dinoflagellate *Alexandrium spp.* on the feeding and reproduction of populations of copepod *Acartia hudsonica*. *Harmful Algae*, 1:113-125

Colin S.P. and Dam H.G. 2002b. Testing for toxic effects of prey on zooplankton using sole versus mixed diets. *Limnol. Oceanogr.*, 47: 1430-1437.

Contreras M., Marsden D. and Munro G. 2011. Effects of short-term exposure to paralytic shellfish toxins on clearance rates and toxin uptake in five species of New Zealand bivalve. *Marine and Fresh Water Res*, 63: 166-174.

Cortés-Altamirano R. and Sierra-Beltrán A. 2008. Biotoxins from freshwater and marine harmful algae blooms occurring in México. *Toxin Reviews*, 27: 27–77.

Cortés-Altamirano R. 1998. *Las mareas rojas*. AGT, Editor, S.A. México, D.F.: 161 pp.

Cruz-Rodríguez LA., Baucum AJ., Soudant P., Chu FL., Hale RC. 2000. Effects of PCBs sorbed to algal paste and sediments on the stress protein response (HSP70 family) in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Mar. Environ. Res.* 50, 341-345.

Cruz-Rodríguez, L A., Chu F-L. E. 2002. Heat-shock protein (HSP70) Response in the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*, Exposed to PAHs Sorbed to Suspended Artificial

Clay Particles and to Suspended Field Contaminated Sediments. *Aquatic Toxicology*. 60: 157-168.

Dahlhoff E.P. 2004. Biochemical indicators of stress and metabolism: applications for marine ecological studies. *Annual Review of Physiology*, 66: 183- 207.

David, E., Tanguy, A., Pichavant, K., Moraga, D., 2005. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. *FEBS Journal* 272: 5635-5652.

Dawson F. J. and Holmes F. B. C. 1999. Molecular mechanisms underlying inhibition of protein phosphatases by marine toxins. *Frontiers in Bioscience*, 4: 646-658

De La Torre B. R. 1994. Determinación de la actividad de superóxido dismutasa en poblaciones humanas normales y patológicas. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.

De Las Heras S., Rodríguez-Jaramillo C., Sierra-Beltrán A. 2009. Effects of toxic dinoflagellate genus *Prorocentrum* on Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *World Aquaculture Proceedings*. Veracruz, México.

Deleury E., Dubreuil G., Elangovan N., Wajnberg E., Reichhart J-M. 2012. Specific versus non-specific immune responses in an invertebrate species evidenced by a comparative *de novo* sequencing study. *PLoS ONE*, 7(3): e32512. doi:10.1371/journal.pone.0032512.

Di Giulio R. T., Washburn P. C., Wenning R. J., Winston G. W., Jewell C. S. 1989. Biochemical responses in aquatic animals: A review of determinants of oxidative stress. *Environmental Toxicology and Chemistry* 8: 1103–1123.

Dheilly N. M., Lelong C., Huvet A. Favrel P. 2011. Development of a Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) 31,918-feature microarray: identification of reference genes and tissue-enriched expression patterns. *BMC Genomics*, 12:468.

Downs C. A., Fauth J.E., Woodley C. M. 2001. Assessing the health of grass shrimp (*Palaeomonetes pugio*) exposed to natural and anthropogenic stressors: A molecular biomarker system. *Marine Biotechnology* 3: 380-397.

Dorion S., Berube J., Huot J., Landry J. 1999. A short lived protein involved in the heat shock sensing mechanism responsible for stress-activated protein kinase 2 (SAPK2/p38) activation. *J. Biol. Chem.* 274: 37591-37597.

Dorion S., Berube J., Huot J., Landry J. 1999. A short lived protein involved in the heat shock sensing mechanism responsible for stress-activated protein kinase 2 (SAPK2/p38) activation. *J. Biol. Chem.* 274: 37591-37597.

Escobedo-Lozano A. Y., Estrada N., Ascencio F., Contreras G., Alonso-Rodríguez R. 2012. Accumulation, biotransformation, histopathology and paralysis in the Pacific Calico Scallop *Argopecten ventricosus* by the paralyzing toxins of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Mar. Drugs*, 10: 1044-1065

Espinosa E.P., Barillé L., Allam B. 2007. Use of encapsulated live microalgae to investigate pre-ingestive selection in the oyster *Crassostrea gigas*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 343:118-126

Estrada N. 2005. Efecto de las toxinas paralíticas (PSP) del dinoflagelado *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) en el sistema de defensa de la almeja mano de león, *Nodipecten subnodosus* (Mollusca: Pectinidae). Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. La Paz, Baja California Sur.

Estrada N., Jesús M. D., Campa-córdova A., y Luna A. 2007a. Effects of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* on hydrolytic and antioxidant enzymes, in tissues of the giant lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* ,146:502–510.



Estrada N., Lagos N., Garcia C., Maeda-Martinez A., Ascencio F. 2007b. Effects of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* on uptake and fate of Paralytic Shellfish poisons in the pacific giant lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus*. *Marine Biology*, 4: 1205-1214.

Fabbri E., Valbonesi P., Franzellitti S. 2008. HSP70 expression in bivalves. Review. *ISJ* 5: 135-161

FAO. 2008-2013. Cultured Aquatic Species Information Program *Crassostrea gigas*. Programa de información de especies acuáticas. *Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO* [en línea]. Roma. [Citado 31 January 2013].

FAO. 2005. Biotoxinas Marinas. Estudio FAO: Alimentación y nutrición. Roma, Italia.

FAO. 2006. Cultured Aquatic Species Information Programme – *Crassostrea gigas*. Text by Helm, M. M. FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome.

Farcy E., Voiseux C., Lebel J. M., Fievet B. 2007. Seasonal changes in mRNA encoding for cell stress markers in the oyster *Crassostrea gigas* exposed to radioactive discharges in their natural environment. *Sci. Total Environ.* 374: 328-341.

Farías A. 2008. Nutrición y alimentación en moluscos bivalvos. En A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds.). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20-24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. *FAO Actas de Pesca y Acuicultura*. No. 12. Roma, FAO. pp. 297–308.

Fessard V., Grosse Y., Pfohl-Leszkowicz A., Puisieux-Dao S. 1996. Okadaic acid treatment induces DNA adduct formation in BHK21 C13 fibroblasts and HESV keratinocytes. *Mutat. Res.* 361, 133–141.

Flórez-Barrós F, Prado-Álvarez M., Méndez J., Fernández-Tajes J. 2011. Evaluation of genotoxicity in gills and hemolymph of clam *Ruditapes decussatus* fed with the toxic

dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 74:15-16, 971-979.

Franzellitti S. and Fabbri E. 2006. Cytoprotective responses in the Mediterranean mussel exposed to  $\text{Hg}^{2+}$  and  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351: 719-725

Fujiki H. and Suganuma M. 1999. Unique features of the okadaic acid activity class of tumor promoters. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 125, 150-5.

Gainey L.F. and Shumway S. E. 1988. A compendium of the responses of bivalve molluscs to toxic dinoflagellates. *Journal of Shellfish Research*, 7(4):623-628.

Galimany E., Sunila I., Hégaret H., Ramon M., Wikfors G. H. 2008. Pathology and immune response of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.) after an exposure to the harmful dinoflagellate *Prorocentrum mínimum*. *Harmful Algae*, 7: 630–638.

Gallo G. M. C., Godínez S. D. y Rivera G. K. 2001. Estudio preliminar sobre el crecimiento y sobrevivencia del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg 1873) en barra de natividad, Jalisco, México. *Universidad y Ciencia*, 17(34):83-91.

Garate-Lizárraga I., Bustillos-Guzmán J., Alonso-Rodríguez R. 2002. Distribution of *G. Catenatum* Graham, in coastal waters of México. *Harmful Algae News* 23: 1-2.

Gárate-Lizárraga I., Muñetón-Gómez M.S., Maldonado-López V. 2006. Florecimiento del dinoflagelado *Gonyaulax polygramma* frente a la Isla Espíritu Santo, Golfo de California (Octubre-2004). *Rev. Invest. Mar.*, 27(1): 31-39

García-Lagunas N. 2011. Toxicogenómica del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793), expuesto a *Gymnodinium catenatum* (Graham 1943) productor de toxinas paralizantes (PSP). Tesis doctoral en preparación. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. La Paz, Baja California Sur.

García-Lagunas N. and Hernández-Saavedra N. Y. 2013. Changes in gene expression in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* as a response to acute exposure to *Gymnodinium catenatum*. Aquaculture Manuscript Draft.

Garrido V. M., Chaparro R. O., Thompsom J. R., garrido O. and Navarro M. J. 2012. Particle sorting and formation and elimination of pseudofaeces in the bivalves *Mulinia edulis* (siphonate) and *Mytilus chilensis* (asiphonate). *Marine Biology*. 159:987-1000.

GEOHAB. 2001. Global ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms, Science Plan. P. Gilbert & G. Pitcher (eds) SCOR y OIC, Baltimore y Paris. 86 pp.

Geret F., Serafim A., Bebianno M. J. 2003. Antioxidant enzyme activities, metallothioneins and lipid peroxidation as biomarkers in *Ruditapes decussates*? *Ecotoxicology* 12:417– 26.

Glibert P. M., Alexander J., Meritt D. W., North E. W., Stoecker D.K. 2007. Harmful algae pose additional challenges for oyster restoration: impacts of the harmful algae *karlodinium veneficum* and *Prorocentrum minimum* on early life stages of the oysters *Crassostrea virginica* and *Crassostrea ariakensis*. *Journal of Shellfish Research*, 26(4): 919–925.

González-Rivera L. 2009. Estudio de la capacidad hepatocarcinogénica del extracto de toxinas diarreicas (DSP) del dinoflagelado *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge, en el modelo del hepatocito resistente en la rata Fischer 344. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. México. 49 pp

González-Romero R., Rivera-Casas C., Fernández-Tajes J., Ausió J., Méndez J., Erín-López J. M. 2012. Chromatin specialization in bivalve molluscs: A leap forward for the evaluation of Okadaic Acid genotoxicity in the marine environment. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 155, 175-181.

Graf D. L., and Foighil D. Ó. 2000. Molecular phylogenetic analysis of 28S rDNA supports a Gondwanan origin for Australasian Hyriidae (Mollusca: Bivalvia: Unionoida). *Vie et Milieu*, 50: 245-254.

Guillard R.L.L. and Ryther R.H. 1975. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. In Smith, W.L. and M.M., Chalg, (Eds) Culture of Marine Invertebrate Animals, Plenum Press. New York. 29-60 pp.

Haberkorn H., Lamberta C., Le Goïca N., Guéguen M., Moal M., Palacios E., Lassus P., Soudanta P. 2010. Effects of *Alexandrium minutum* exposure upon physiological and hematological variables of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*. *Aquatic Toxicology*. 97: 96–108

Haberkorn H., Tran D., Massabuau J. C., Ciret P., Savar V., Soudant P. 2011. Relationship between valve activity, microalgae concentration in the water and toxin accumulation in the digestive gland of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to *Alexandrium minutum*. *Marine Pollution Bulletin*, 62(6): 1191-1197.

Hallegraeff G. M. 1995. Harmful algal blooms: a global overview, *In: Manual on Harmful Marine Microalgae*. Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (eds.) IOC Manuals and Guides, No.33, UNESCO, pp. 1–22.

Hamer B., Hamer D. P., Muller W. E., Batel R. 2004. Stress-70 proteins in marine mussel *Mytilus galloprovincialis* as biomarkers of environmental pollution: a field study. *Environ. Int.* 30: 873-882.

Haslbeck M. 2002. sHsps and their role in the chaperone network. *Cell Mol Life Sci* 59, 1649–1657.

Hatanaka R, Sekine Y., Hayakawa T., Takeda K., Ichijo H. 2009. Signaling pathways in invertebrate immune and stress response. *ISJ*, 6: 32-43.

Hedgecock D., Gaffney P. M., Gouletquer P., Ximing Guo X., Reece K., Warr G. 2009. The case for sequencing the pacific oyster genome. *Journal of Shellfish Research*, 24 (2): 429–441.

Hégaret H. and Wikfors H. G. 2005. Effects of natural and field-simulated blooms of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* upon hemocytes of eastern oysters, *Crassostrea virginica*, from two different populations. *Harmful Algae*, 4: 201–209.

Hégaret H., Wikfors G. H., Soudant P., Lambert C., Bérard J. B. 2007. Minimal apparent effect on oyster hemocytes. *Aquat. Living Resour.*, 152: 441-447.

Hégaret H., Wikfors G. H., Shumway S. E. 2007. Diverse feeding responses of five species of bivalve mollusc When exposed to three species of harmful algae. *Journal of Shellfish Research*, Vol. 26(2), 549–559.

Hégaret H., da Silva P., Sunila I., Shumway S., Dixon M., Alix J., Wikfors G., Soudant P. (2009) Perkinsosis in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* affects responses to the harmful-alga, *Prorocentrum minimum*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **371**, 112-120.

Hégaret H., Mirella Da Silva P., Wikfors G. H., Haberkorn H., Shumway S. E., Soudant P. 2011. *In vitro* interactions between several species of harmful algae and haemocytes of bivalve molluscs. *Cell Biol Toxicol.*, 27:249–266.

Heininger Y.M.W., Poynter M.E., Baeuerle P.A. Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor • B. *Free Rad. Biol. Med.* 2000; 28: 1317-1327.

Helm M.M., Bourne N. y Lovatelli, A. 2006. Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. *FAO Documento Técnico de Pesca*. No. 471. Roma, FAO. 182 pp.

Heredia-Tapia A., Arredondo-Vega B.O., Núñez-Vázquez E.J., Yasumoto T., Yasuda M. and Ochoa, J.L. 2002. Isolation of *Prorocentrum lima* (Syn. *Exuviaella lima*) and diarrhetic shellfish poisoning (DSP) risk assessment in the Gulf of California, México. *Toxicon*, 40: 1121-1127.

Hernández-Orozco M.L. and Gárate-Lizárraga I. 2006. Síndrome de envenenamiento paralizante por consumo de moluscos. *Revista Biomedica*, 17(1):45-60.

Hernández-Becerril D.U., Rodríguez-Palacio M.C., Lozano-Ramírez C. 2010. Morphology of two bloom-forming or potentially toxic marine dinoflagellates from the Mexican pacific, *Heterocapsa pygmaea* and *Protoceratium reticulatum* (Dinophyceae). *Cryptogamie, Algologie*. 31: 245-254.

Herrera-Sepúlveda A., Sierra-Beltrán A., Hernández-Saavedra N. 2008. Floraciones Algales Nocivas: perspectivas y estrategias biotecnológicas para su detección. *BioTecnología*, 12(1): 23-40.

Houben A., Demidov D., Caperta, A.D., Karimi, R., Agueci, F., Vlasenko, L., 2007. Phosphorylation of histone H3 in plants a dynamic affair. *Biochim. Biophys. Acta* 1769, 308–315.

Huvet A., Gerard A., Ledu C., Phelipot P., Heurtebise S.Z., Boudry P. 2002. Is fertility of hybrids enough to conclude that the two oysters *Crassostrea gigas* and *Crassostrea angulata* are the same species? - *Aquat. Living Resour.* 15: 45-52.

Kao C. Y. 1993. Paralytic shellfish poisoning. En: *Algal toxins in seafood and drinking water*. I. R. Falconer (Ed). Academic Press E. U. A. Pp 75-86

Konoki K., Saito K., Matsuura H., Sugiyama N., Cho Y., Yotsu-Yamashita M., Tachibana K. 2010. Binding of diarrheic shellfish poisoning toxins to okadaic acid binding proteins purified from the sponge *Halichondria okadai*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18:7607–7610.

Koppenol W.H. 2001. The Haber-Weiss cycle – 70 years later. *Redox Report*, 6(4): 229–234.

Kulinsky V.I. and Kolesnichenko L.S. 1990. Biological Role of Glutathione, *Uspekhi Sovrem. Biol.*, , vol. 10,issue 1(4), pp. 20–33.

Lansberg J. 2002. The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. págs. 146-15. *En: Stickney, R. (Ed.). Reviews in Fisheries Science*, 10 (2): 113-390 CRC Press.

Lassus P., Baron R., Garen P., Truquet P., Masselin P., Bardouil M. 2004. Paralytic Shellfish poison outbreaks in the Penzé estuary : Environmental factors affecting toxin uptake in the oyster , *Crassostrea gigas*. *Aquat. Living Resourc.*, 214, 207-214

Le Hegarat L., Puech L., Fessard V., Poul J.M., Dragacci S. 2003. Aneugenic potential of okadaic acid revealed by the micronucleus assay combined with the FISH technique in CHO-K1 cells. *Mutagenesis* 18, 293–298.

Leverone J. R., Shumway S. E., Blake, N. J. 2007. Comparative effects of the toxic dinoflagellate *Karenia brevis* on clearance rates in juveniles of four bivalve mollusks from Florida, USA. *Toxicon*. 49: 634-645.

Lindahl O. 1998. Occurrence and monitoring of harmful algae in the marine environment. *In: Micotoxins and phycotoxins developments in chemistry, toxicology and food safety*. Miraglia, M., Van Egmond, H., Brera, C. & Gilberts J. (eds). *Proceedings of the IX International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins*. pp. 409-423.

Livak K. J., Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 25:402e8.

Llera-Herrera R. A. 2008. Expresión molecular de vitelogeninas en el ostión japonés, *Crassostrea gigas*. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. La Paz, Baja California Sur. pp. 1-7.

Lobban S. C., Chapman J. D. and Kremer P. B. 1988. *Experimental Phycology: A Laboratory Manual*. Cambridge University Press. 1st. Ed.

López S. J. A. 2003. Tasa de filtración y aclaramiento en la almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus* Sowerby, 1835) a dos tallas, en función de la temperatura y

cantidad del alimento. Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. La Paz, Baja California Sur. pp 12-13.

López-Rodas V., Maneiro E., Martínez J., Navarro M., Costas E. 2006. Harmful algal blooms, red tides and human health: diarrhetic shellfish poisoning and colorectal cancer. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 72, 391–408.

López-Cuevas A. 2009. Determinación de la cinética de crecimiento de *Prorocentrum lima* (PRL-1). Memoria de Residencia Profesional. Instituto Tecnológico de La Paz. Baja California Sur.

López-Cuevas A. 2013. Efecto de la exposición de juveniles del ostión japonés *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) a dinoflagelados tóxicos productores de toxinas DSP y PSP. Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. La Paz, Baja California Sur.

López-Flores I., Ruiz-Rejon C., Cross I., Rebordinos L., Robles F., Navajas-Pérez R., De la Herran R. 2010. Molecular caracterización and evolution of an interspersed repetitive DNA family of oysters. *Genetica*, 138:1211-1219.

Malham S. K., Cotter E., O'Keeffe S., Lynch S., Sarah C., Beaumont A. R. 2009. Summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in the Irish Sea: the influence of temperature and nutrients on health and survival. *Aquaculture*, 287: 128–138.

Manduzio H., Rocher B., Durand F., Galap C., Leboulenger F. 2005. The point about oxidative stress in mollusks. *Review ISJ*, 2: 91-104.

Manfrin C., De Moro G., Torboli V., Venier P., Pallavicini A, Gerdol M. 2012. Physiological and molecular responses of bivalves to toxic dinoflagellates. *ISJ* 9: 184-199, 2012

Margalef R. 1978. Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment. *Oceanologica Acta*, 1: 493-509.



Martin-López A., Gallardo R. J. J., Sánchez M. A., García C. F., Molina G. E. 2011. Immunoregulatory potential of marine algal toxins yessotoxin and okadaic acid in mouse T lymphocyte cell line EL-4. *Toxicology Letters*, 207: 167– 172.

Mathews V.H. 2003. Bioquímica. Editorial Addison Wesley. 593-595 pp.

Matias G. W. and Creppy E. E.1996. Lipid peroxidation induced by okadaic acid, a marine toxin, in Vero cell cultures: prevention by superoxide dismutase+catalase, vitamin C and vitamin E. *Toxicol. Lett.* 88, 21.

Matus-Hernández M. A. 2013. Expresión diferencial de proteínas en juveniles de ostión japonés *Crassostrea gigas* expuestos a organismos del género *Prorocentrum* spp. Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. La Paz, Baja California Sur.

Maynes J. T., Bateman S.K., Cherney M. M., Das K.A., Luu A.H., Holmes F.B., James N. G. 2001. Crystal Structure of the Tumor-promoter Okadaic Acid Bound to Protein Phosphatase-1. *Journal of Biological Chemistry*, 276(47): 44078–44882.

Mazón-Suastegui J. M. 1996. Cultivo de Ostión Japonés. In: Estudio del potencial pesquero y Acuícola de Baja California Sur. (Síntesis) pp 625-650.

Meistertzheim A.-L., Tanguy A., Moraga D., Thébault, M-T. 2007. Identification of differentially expressed genes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to prolonged thermal stress. *FEBS Journal*, 274: 6392–6402. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.06156.x

Mello D. F., De Oliveira E. S., Vieira R. C., Simoes E., Trevisan R., Dafre A. L. 2012. Cellular and transcriptional responses of *Crassostrea gigas* hemocytes exposed in vitro to brevetoxin (PbTx-2). *Mar. Drugs* 10: 583-597,

Minier C., Borghi V., Moore M. N., Porte C. 2000. Seasonal variation of MXR and stress proteins in the common mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 50:167-176.

Moggs J.G. and Orphanides G., 2004. The role of chromatin in molecular mechanisms of toxicity. *Toxicol. Sci.* 80, 218–224.

Mons M. N., Van Egmond H. P., Speijers G.J.A. 1998. Paralytic shellfish poisoning: A review. RIVM Report 388802 005.

Moreno I., Pichardo S., Jos Á., Gómez-Amores L., Mate A., Vázquez, C.M., Caemian, A.M., 2005. Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to microcystin-LR administered intraperitoneally. *Toxicon.* 45, 395–402

Murata M., Kumakai M., Soo Lee J. and Yasumoto T. 1987. Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning. *Tetrahedron Lett.*, 28:5869–5872.

Murray B. W., Busby, E. R., Mommsen, T. P., Wright P.A. 2003. Evolution of glutamine synthetase in vertebrates: multiple glutamine synthetase genes expressed in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.* 206(9): 1511-1521.

Newell R. I. E. and Jordan S. J. 1983. Preferential ingestion of organic material by the American oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 13: 47–53.

Ochoa J. L., Sánchez-Paz A., Cruz-Villacorta A., Nuñez-Vazquez E., Sierra-Beltrán, A. 1997. Toxic events in the northwest Pacific coastline of Mexico during 1992-1995: Origin and impact. *Hidrobiology*, 352: 195-200.

Ochoa J. L. 2003. The “ENSO” Phenomenon and the Toxic “Red Tides” in Mexico. *Geophysics Int.*, 42(3): 505-515.

Pales-Espinosa E., Allam B., Pord E. S. 2008. Particle selection in the ribbed mussel *Geukensia demissa* and the eastern oyster *Crassostrea virginica*: Effect of microalgae Growth satge. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 79: 1-6.

Pennec J. P., Talarmin H., Droguet M., Giroux-Metges M. A., Gioux M. and Dornage G. 2004. Characterization of the voltage-activated currents in cultured atrial myocytes isolated from the heart of the common oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Biology*, 207: 3935-3944.

Pérez-Linares J., Ochoa J. L., Martínez C. A. 2008a. Retention and tissue damage of PSP and NSP toxins in shrimp: Is cultured shrimp a potential vector of toxins to human population? *Toxicon*, 53: 185–195.

Pérez-Linares J., Ochoa J. L., Martínez C. A. 2008b. Effect of PSP Toxins in White Leg shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone. *Journal of Food Science*, 73(4): 69-73.

Poma Hugo R., Davies C, Gutiérrez C. D., Mora M. C., Basombrío M. Á. y Rajal V. B. 2012. Comparación de la eficiencia de extracción de ácidos nucleicos utilizando distintos kits comerciales y empleando la qPCR: Efecto de las sustancias inhibidoras. *Rev. Argent. Microbiol.*, [revista en la Internet]. 2012 Sep [citado 2013 Ene 31] ; 44(3): 144-149.

Rausch de Traubenberg C. and Morlaix M. 1995. Evidence of okadaic acid release into extracellular medium in cultures of *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge. In: Lassus, P. (ed.) Harmful algal blooms, vol. 6. Elsevier, Amsterdam, pp. 493-498.

Repetto M. G. 2009. Toxicología Fundamental. 2ª Edición, Ed. Doyma, México, 672 p.

Ringwood A.H. and Connors D.E. 2000. The effects of glutathione depletion on reproductive success in oysters, *Crassostrea virginica*. *Mar. Environ. Res.* 50: 207-211.

Röder K., Fritz N., Gerds G., Luckas B. 2011. Accumulation and depuration of yessotoxin in two bivalves. *Journal of Shellfish Research*, 30(1): 167–175.

Romero-Geraldo R. 2010. Identificación molecular y estudio de la expresión diferencial de genes en el ostión del pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), como respuesta a la exposición a un dinoflagelado productor de toxinas marinas de tipo diarreico. Tesis

doctoral en preparación. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. La Paz, Baja California Sur.

Romero-Geraldo R. J. and Hernández-Saavedra N. Y. 2012. Stress Gene Expression in *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) in response to experimental exposure to the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge, 1975. *Aquaculture Research*, doi:10.1111/are.12100

Ronsón-Paulín, J. A. 1999. Análisis retrospectivo y posibles causas de mareas rojas tóxicas en el litoral del sureste mexicano (Guerrero, Oaxaca, Chiapas). *Ciencia y Mar*, 9: 49–55.

Ruppert E. and Barnes D. 1995. Zoología de los Invertebrados. Sexta Edición. Ed. McGraw-Hill Interamericana. México

Samain J. F., Degremont L., Soletchnik P., Haure J., Bedier E., Ropert M., Moal J., Huvet A., Bacca H., Van Wormhoudt A., Delaporte M., Costil K., Pouvureau S., Lambert C., Boulo V., Soudant P., Nicolas J. L., Le Roux F., Renault T., Gagnaire B., Geret F., Boutet I., Burgeot T., Boudry P. 2007. Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics infection process. *Aquaculture*, 268: 227.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Volumen 2. Cold Spring Harbour Laboratory, New York.

Schantz E. J., Mold J., Stanger D., Shavel J., Riel F., Bowden J., Lynch J., Wyler R., Riegel B., Sommer H. 1957. Paralytic shellfish poison VI. A procedure for the isolation and purification of the poison from toxic clams and mussel tissues. *J. Am. Chem. Soc.*, 79: 5230–5235.

Shantz E. J. 2006. Chemistry and biology of saxitoxin and related toxins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 479: 15-23.

- Shumway S. E. 1990. A review of the effects of algal blooms on Shellfish and aquaculture. *J. World Aquaculture Society*, 21: 65-104.
- Shumway S. E. 1991. *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. Elsevier. E. U. A. 1095 pp.
- Sierra-Beltrán A. 2010. *Manual de operación del Laboratorio Húmedo de Seguridad Biológica Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, México*. 33p.
- Sierra-Beltrán A.P., Lluch-Cota D. B., Lluch-Cota S. E., Cortés-Altamirano R., Cortés-Lara M. C., Castillo-Chávez M., Carrillo L., Pacas L., Víquez R., García-Hansen I. 2004. Dinámica espacio-temporal de organismos precursores de marea roja en la costa pacífica de América del Norte y Centroamérica. *Rev. Biol. Trop.*, 52: 99-108.
- Sierra-Beltrán A. P., Morquecho-Escamilla M. L., Lechuga-Devezé C. H., Ochoa J. L. 1996. PSP monitoring program at Baja California Sur, Mexico. Pp 105-108. En: *Harmful and toxic algal blooms*. Yasumoto, T., Oshima, Y. & Fukuyo, Y. (Eds). Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. pp 586.
- Sierra-Beltrán A. P., Cruz-Villacorta A., Núñez-Vázquez E., Del Villar L. M., Crerecero J., Ochoa J.L. 1998. An overview of the marine food poisoning in Mexico. *Toxicon*, 35: 447-453.
- Spiegel M. R., Schiller J., Srinivasan R. A. 2007. *Probabilidad y Estadística Schaum (2ª edición)*. México D.F.: McGraw-Hill. pp. 335-371.
- Svensson S, Särngren A, Förlin L. 2003. Mussel blood cells, resistant to the cytotoxic effects of okadaic acid, do not express cell membrane p-glycoprotein activity (multixenobiotic resistance), *Aquatic Toxicology*, Volume 65, Issue 1, Pages 27-37, ISSN 0166-445X, 10.1016/S0166-445X(03)00097-3.

Svensson S. and Förlin L. 1998. Intracellular effects of Okadaic acid in the mussel *Mytilus edulis*, and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Marine Environmental Research*, 46 (1-5): 449-452.

Takahashi K. G., Mori K. 2000. Functional Profiles of Hemocytes in the bio-defense Process of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *Tohoku J Agric Res* 51: 15–27.

Takai A., Bialojan C., Troschka M., Rüegg J. C. 1987. Smooth muscle myosin phosphatase inhibition and force enhancement by black sponge toxin. *FEBS Lett.* 217, 81–4.

Tamburini B. A., Tyler J. K., 2005. Localized histone acetylation and deacetylation triggered by the homologous recombination pathway of double-strand DNA repair. *Mol. Cell. Biol.* 25, 4903–4913.

Tanguy A., Boutet I., Laroche J., Moraga, D. 2005. Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to pesticide exposure. *The FEBS Journal* 272 390-403.

Tomanek L., Zuzow M. J, Anna V., Ivanina E. B., Sokolova I. M. 2011. Proteomic response to elevated PCO<sub>2</sub> level in eastern oysters, *Crassostrea virginica*: evidence for oxidative stress. *Journal of Experimental Biology* 214, 1836-1844.

Tran D., Haberkom H., Soudant P., Ciret P., Massabuau J. C. 2010. Behavioral responses of *Crassostrea gigas* exposed to the Harmful algae *Alexandrium minutum*. *Aquaculture*, 298: 338-345.

Traore A., Baudrimont I., Ambaliou S., Dano S. D., Creppy E. E. 2001. DNA breaks and cell cycle arrest induced by okadaic acid in Caco-2 cells, a human colonic epithelial cell line. *Arch. Toxicol.* 75, 110–117.

Urrutia B. M., Navarro E., Ibarrola I., Iglesias P. 2001. Preingestive selection process in the cockle *Cerastoderma edule*: mucus production related to rejection of pseudofaeces. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 209: 177-187.

Valdiglesias V., Mendez J., Pasaro E., Cemeli E., Anderson D., Laffon B., 2010. Assessment of okadaic acid effects on cytotoxicity, DNA damage and DNA repair in human cells. *Mutat. Res.* 689, 74–79.

Valdiglesias V., Laffon B., Pasaro E., Cemeli E., Anderson D., Mendez J. 2011. Induction of oxidative DNA damage by the marine toxin okadaic acid depends on human cell type. *Toxicon* 57, 882–888.

Van Dolah F. M. and Ramsdell J. S. 1992. Okadaic acid inhibits a protein phosphatase activity involved in formation of the mitotic spindle of GH4 rat pituitary cells. *J. Cell. Physiol.* 151, 190–198.

Van Holde K.E., 1988. *Chromatin*. Springer-Verlag, New York, NY

Vargas-Albores F. and Barracco P. 2001. Mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos, con énfasis en pectinidos. Pp 127-146 En: A. N Maeda (ed.). *Los moluscos pectinidos de Iberoamérica: Ciencia y cuicultura*. Limusa. Mexico.

Vásquez-Botello A. 2005. *Curso Básico de Toxicología Ambiental*. 3ª Edición, Editorial Limusa, México, 695 P.

Ward J. E. and Shumway S. E. 2004. Separating the grain from the chaff: Particle selection in suspension- and deposit-feeding bivalves. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 300: 83-130.

Whalen E. K., Morin D., Lin Y. C., Tjeerdema S. R., Goldstone V. J., Hahn E. M. 2008. Proteomic identification, cDNA cloning and enzymatic activity of glutathione S-transferases from the generalist marine gastropod, *Cyphoma gibbosum*. *Arch Biochem. Biophys.* 478, 7–17.

White A. W. 1981. Marine Zooplankton can accumulate and retain dinoflagellate toxins and cause fish kills. *Limnol. Ocenogr.*, 26: 103-109.

- Wiese M. and D'Agostino P. M. 2010. Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs. *Marine Drugs*, 8:2185-2211.
- Wikfors G. H. and Patterson G. W. 1994. Differences in strains of *Isochrysis* important to mariculture. *Aquaculture*. 123:127-135.
- Wikfors G. H. and Smolowitz R. M. 1993. Detrimental effects of a *Prorocentrum* isolate upon hard clams and bay scallops in laboratory feeding studies. In: Smayda, T.J., Shimizu, Y. (Eds.), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier, New York, pp. 447-452.
- Wikfors G. H. and Smolowitz R. M. 1995. Experimental and histological studies of four life- history stages of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, exposed to a cultured strain of the dinoflagellate *Prorocentrum mínimum*. *Biol. Bull.*, 188: 313-328.
- Wikfors G. H. 2005. A review and new analysis of trophic interactions between *Prorocentrum minimum* and clams, scallops and oysters. *Harmful Algae*, 4: 585-592.
- Wildish D., Lassus P., Martin J., Saulnier A., Bardouil M. 1998. Effect of the PSP-causing dinoflagellate, *Alexandrium sp.* on the initial feeding response of *Crassostrea gigas*. *Aquat. Living Resour.*, 11: 35-43.
- Windust A., Wright J. L. C., Mclachlan J. L. 1996. The effects of the diarrhetic shellfish poisoning toxins, okadaic acid and dinophysistoxin-1, on the growth of microalgae. *Mar. Biol.* 126: 19-25.
- Yang X., Lin X., Ji X., Xu Z., Huang C. 2001. The effects of light intensity, temperatura and salinity on the filtration rate of *Perna viridis*. *Mar. Sci./Haiyang Kexue. Qingdao*, 24 (6): 36-39.
- Yasumoto T., Murata M. 1993. Marine toxins. *Chem. Rev.* 93, 1897–1909.



Yu Z., He X., Fu D., Yang Zhang Y. 2011. Two superoxide dismutase (SOD) with different subcellular localizations involved in innate immunity in *Crassostrea hongkongensis*. *Fish y Shellfish Immunology* 31. 533:539.

Zhang C., Fang X., Guo X., Li L., Lou R., Xu F., Yang P., Zhang L., Wang X., Qi H., Xion Z., Que H., Xie Y., Holland P. W., Paps J., Wu F., Chen Y., Peng C., Hedgecock D., Li J., Wang W., Fu W., Song X., Zheng S., Liu B., Li Y., Chen L., Qian L. 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature*, 490: 49-54.

Zhou J. and L. Fritz. 1994. Okadaic acid antibody localizes to chloroplasts in the DSP-toxin-producing dinoflagellates *Prorocentrum lima* and *Prorocentrum maculosum*. *Phycologia*, 33(6): 455-461.

Zingone A., Enevoldsen H.O. 2000. The diversity of harmful algal blooms: a challenge for science and management. *Ocean Coastal Management*, 43: 725–48.

Zlatanova J., Bishop T. C., Victor J. M., Jackson V., Van Holde K. 2009. The nucleosome family: dynamic and growing. *Structure* 17, 160–171.

<http://www.aquabreeding.eu>

[http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona\\_programa\\_maestro\\_nacional\\_](http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona_programa_maestro_nacional_)

<http://www.fao.org/docrep/009/y5720s/y5720s00.HTM>

[http://www.fao.org/fi/website/FIRetrieveAction.do?dom=culturespecies&xml=Crassostrea\\_gigas.xml](http://www.fao.org/fi/website/FIRetrieveAction.do?dom=culturespecies&xml=Crassostrea_gigas.xml)

[http://www.uhh.hawaii.edu/~pacrc/Mexico/files/bmp\\_kwei\\_lin/red\\_tides\\_biotoxins.pdf](http://www.uhh.hawaii.edu/~pacrc/Mexico/files/bmp_kwei_lin/red_tides_biotoxins.pdf)

Plan maestro, sistema producto ostión Sonora

[http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona\\_programa\\_maestro\\_ostionsonora](http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona_programa_maestro_ostionsonora)

Programa Maestro Nacional de Ostión

[http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona\\_programa\\_maestro\\_nacional\\_ostion](http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona_programa_maestro_nacional_ostion)