



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE
JUVENILES DE *Crassostrea gigas* ANTE SU
EXPOSICIÓN AL DINOFLAGELADO
PRODUCTOR DE TOXINAS PARALIZANTES
*Gymnodinium catenatum***

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales

(Orientación en Biotecnología)

Presenta

Norma García Lagunas

La Paz, Baja California Sur, Junio de 2014

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 06 del Mes de Junio del 2014, 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:

"Cambios en la expresión génica de juveniles de *Crassostrea gigas* ante su exposición al dinoflagelado productor de toxinas paralizantes *Gymnodinium catenatum*"

Presentada por el alumno:

Norma Garcia Lagunas

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

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

LA COMISION REVISORA

 Norma Y. Hernández Saavedra DIRECTOR DE TESIS	 Silvia A. Garcia Gasca CO-TUTOR
 Gopal Murugan CO-TUTOR	 Daniel Tovar Ramirez CO-TUTOR
 Alfonso N. Maeda Martinez 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

Dra. Silvia A. García Gasca CIAD, Campus Mazatlán

Dr. Alfonso N. Maeda Martínez CIBNOR, Campus La Paz

Dr. Gopal Murugan CIBNOR, Campus La Paz

Dr. Dariel Tovar Ramírez CIBNOR, Campus La Paz

Comité Revisor de Tesis

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

Dra. Silvia A. García Gasca CIAD, Campus Mazatlán

Dr. Alfonso N. Maeda Martínez CIBNOR, Campus La Paz

Dr. Gopal Murugan CIBNOR, Campus La Paz

Dr. Dariel Tovar Ramírez CIBNOR, Campus La Paz

Jurado de Examen

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

Dra. Silvia A. García Gasca CIAD, Campus Mazatlán

Dr. Alfonso N. Maeda Martínez CIBNOR, Campus La Paz

Dr. Gopal Murugan CIBNOR, Campus La Paz

Dr. Dariel Tovar Ramírez CIBNOR, Campus La Paz

Suplente

Dra. Reyna de Jesús Romero Geraldo Instituto Tecnológico de La Paz

Dra. Thelma Castellanos Cervantes CIBNOR, Campus La Paz

RESUMEN

El ostión del Pacífico, *Crassostrea gigas*, es una especie filtroalimentadora, que acumula toxinas durante las floraciones algales nocivas (FAN). Las toxinas paralizantes (PST), son producidas por algunas especies de dinoflagelados, entre ellas *Gymnodinium catenatum*. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la exposición al dinoflagelado *G. catenatum* sobre la expresión génica de juveniles del ostión *C. gigas*. Los primeros bioensayos se realizaron con juveniles de 3 ± 1 mm de talla, donde se probaron las siguientes dietas: control no tóxico (control negativo) *Isochrysis galbana* (0.75×10^6 cel mL⁻¹), control tóxico (control positivo) *G. catenatum* (3×10^3 cel mL⁻¹) y dos dietas mixtas *G. catenatum* (3×10^3 y 30×10^3 cel mL⁻¹) + *I. galbana* (0.75×10^6 cel mL⁻¹). Se monitoreó el nivel de expresión de genes de proteínas de estrés, detoxificación, regulación de ácidos nucleicos, respuesta inmune y citoesqueleto en dos fases: aguda (24 h) y subcrónica (14 d). En los segundos bioensayos se utilizaron juveniles de 50 ± 10 mm de talla y se probaron las dietas: control no tóxico *I. galbana* (2×10^6 cel mL⁻¹), control tóxico *G. catenatum* (6×10^3 cel mL⁻¹) y mixta *I. galbana* (2×10^6 cel mL⁻¹) + *G. catenatum* (6×10^3 cel mL⁻¹), donde se analizó el nivel de transcripción de los genes mencionados anteriormente en glándula digestiva y hemocitos por 7 días. Los análisis se realizaron mediante PCR punto final y PCR en tiempo real (qRT-PCR). Además, se realizaron análisis histológicos en los ostiones de las dos tallas. Se encontró que los ostiones de ambas tallas al estar expuesto a *G. catenatum*, redujeron su tasa de aclaramiento y produjeron pseudoheces, los síntomas fueron tiempo-dosis-dependiente. Se demostró que una exposición aguda a *G. catenatum* sobreexpresó los siguientes genes: *sod-cu/zn*, *gst-s*, *gs*, *lgbp* y *cyp356A1* activando un mecanismo de respuesta inmediata al estrés y de protección a la toxicidad en el ostión; una exposición subcrónica incrementó significativamente el nivel de transcrito de dichos genes. La sobreexpresión de otros genes *p21* y *p53* proporciona una evidencia de daño al ADN y posible genotoxicidad. La represión de los genes de *act* y *tub β* probablemente indican una desestabilización del citoesqueleto. La sobreexpresión en *casp1* sugiere la activación de un proceso inflamatorio. En la glándula digestiva de los ostiones de mayor talla, se encontró sobreexpresión de los genes *p21*, *ef2*, *cafp55*, *p53*, *casp 1* y *act* a partir del día 3 con un incremento significativo en el día 7; esto sugiere una posible activación de los mecanismos celulares de la replicación y reparación del ADN dañado. En hemocitos, la mayor sobreexpresión de genes involucrados en sistema inmune (*lgbp*, *if44*, *cvt* y *hsp70*) se encontró a las 24 h de exposición, el aumento fue mayor en los ostiones expuestos al control tóxico. Por último, se corroboraron los daños en los tejidos de los organismos expuestos a *G. catenatum*, como: aplanamiento celular, inflamación, ruptura, exfoliación, y metaplasia en la glándula digestiva, inflamación generalizada y diapédesis de hemocitos en intestino, alteración de los filamentos branquiales, fusión en branquia, posible edema en músculo, principalmente en los ostiones de 3 ± 1 mm. Estos resultados proporcionan cambios en el perfil de expresión génica mostrando una clara modulación de genes implicados en diferentes rutas esenciales para mantener la homeostasis del ostión del Pacífico, aunado al daño en los diferentes tejidos del ostión, ocasionado por la exposición al dinoflagelado productor de PST.

Palabras clave: Expresión génica, *Gymnodinium catenatum*, *Crassostrea gigas*, toxinas PST

ABSTRACT

The Pacific oyster *Crassostrea gigas* is a filter feeding species that accumulates toxins associated with harmful algal blooms (HABs). Paralyzing toxins (PST) are produced by some dinoflagellate species and *Gymnodinium catenatum* is one of them. The aim of this study was to determine the effect of *G. catenatum* exposure on gene expression of juvenile oyster *C. gigas*. In the first bioassays juveniles 3 ± 1 mm in length that were tested with the following diets: *Isochrysis galbana* nontoxic Control or negative control (0.75×10^6 cel mL⁻¹), toxic control or positive control *G. catenatum* (3×10^3 cel mL⁻¹), and two mixed diets of *G. catenatum* (3×10^3 and 30×10^3 cel mL⁻¹) + *I. galbana* (0.75×10^6 cel mL⁻¹). The level of expression of stress protein, detoxification, cell cycle regulation, immune response, and cytoskeleton was monitored in acute (24 h) and sub-chronic (14 days) periods. Second bioassays were performed on juveniles of 50 ± 10 mm in size with diets: *I. galbana* negative control (2×10^6 cells mL⁻¹), *G. catenatum* positive control (6×10^3 cells mL⁻¹), and mixed *I. galbana* (2×10^6 cells mL⁻¹) + *G. catenatum* (6×10^3 cells mL⁻¹) in which transcript levels of the genes previously mentioned in the digestive gland and hemocytes was analyzed for 7 days. Analyses were performed by end point and real-time PCR (qRT-PCR). Furthermore, histological analyzes were performed in oysters from two sizes, finding that irrespective of size, oysters reduced their clearance rate and produced pseudofeces in the presence of *G. catenatum*, symptoms that were time-dose-dependent. It was demonstrated that acute exposure to *G. catenatum* produced overexpression of *sod-cu/zn*, *gst-s*, *gs*, *lgbp* and *cyp356A1* indicating activation of an immediate response mechanism to stress and toxicity protective in oysters; subchronic exposure significantly increased transcript levels. The up-regulation of others genes like *p21* and *p53* transcription provided a strong evidence of DNA damage and potential PST genotoxicity. Down-regulation of the *act* and *tub β* transcription genes might indicate a destabilization of the cytoskeleton arrangement. The up-regulation of the *casp 1* gene suggests activation of an inflammatory process. A significant expression increase was found in those genes participating on cell cycle regulation (*p21*, *p53*, *cafp55*, *ef2*), *act*, and *casp 1* on oysters' digestive gland mainly at days 3 and 7, suggesting a possible activation of these genes in the cellular replication and repair mechanisms of damaged DNA. In hemocytes, the overexpression of the genes involved in the immune system (*lgbp*, *if44*, *cvt y hsp70*) was found at 24-h exposure; the increase was greater in oysters exposed to the diet consisting only *G. catenatum*. Finally, damage such as cellular flattening, swelling, rupture, exfoliation, and metaplasia in digestive gland tubules; generalized inflammation, hemocyte infiltration or diapedesis through the epithelium of the intestine; structural deformities caused by fusion of the gill filaments, cell volume loss, and possible edema in muscle, mainly in oysters 3 ± 1 mm were corroborated due *G. catenatum* exposure. Results of this study provide changes in the gene expression profile showing a clear modulation of the genes involved in different pathways essential for maintaining oysters' homeostasis, coupled with damage in different oysters' tissues caused by PST dinoflagellate that produces PST.

Key words: Gene expression, *Gymnodinium catenatum*, *Crassostrea gigas*, PST toxins

DEDICATORIA

A mis padres:

Cristina Lagunas Amaya

Francisco García Lucas

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca otorgada para la realización de mis estudios.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, por las facilidades de transporte, de acceso y uso de sus instalaciones durante todo el tiempo que duró mi preparación para lograr la meta del Doctorado.

A la Dirección de Posgrado, dirigida por la Dra. Eliza Serviere Zaragoza (Osvelia Ibarra, Leticia Gonzáles, Claudia Olachea y Tania Nuñez) por todo el apoyo técnico, administrativo y económico que me brindó, para mi estancia y principalmente en los meses finales del trabajo.

Al comité de Tesis conformado por la Dra. Alejandra García, Dra. Norma Hernández, Dr. Alfonso Maeda, Dr. Dariel Tovar y Dr. Gopal Murugan, quienes me apoyaron en todo momento con revisiones de documentos, firmas, consejos y sugerencias para la mejora de este trabajo.

Un agradecimiento especial a mi directora de tesis la Dra. Norma Hernández, por todo su apoyo, por sus palabras de aliento en los momentos difíciles, por su confianza, enseñanzas, paciencia con mis revisiones y principalmente por su amistad.

Al técnico Arturo Sierra Beltrán por sus asesorías, consejos respecto a la realización del trabajo, apoyo para la realización de los bioensayos, por su disponibilidad a la hora de ayudar y por su amistad.

A la Dra. Reyna Romero, por todo su apoyo durante el desarrollo de los bioensayos y estandarización de las técnicas de laboratorio. Además, porque fuiste mi compañera de trabajo y gran maestra, por tus consejos en los momentos difíciles y por tu amistad incondicional.

A la M en C. Claudia Pérez por su ayuda en la toma de fotografías durante la realización de los bioensayos, por brindarme tu amistad incondicional e invitarme a conocer más de cerca los pastos marinos.

Al personal del Laboratorio de alimento vivo, Cynthia Aldana, Adriana Green y Julián Garzón,; así como al técnico encargado de los ceparios Marte Virgen, que gracias a ellos siempre conté con el material biológico necesario en cada uno de los experimentos.

Al Dr. Felipe Ascencio y la Dra. Marta Reyes por las facilidades otorgadas para el acceso a su laboratorio para llevar a cabo el trabajo de PCR en tiempo real.

Al grupo de Microbiología Ambiental, liderado por los Doctores Yoav Bashan y Luz Estela de Bashan por permitirme el uso del microscopio y recibirme en su laboratorio como miembro honorario del grupo. Así como al técnico responsable M en C Manuel Moreno por su ayuda invaluable en el asesoramiento de la parte estadística, por su disponibilidad a la hora de ayudar y por su gran amistad.

A la Maestra Diana Dorantes por su apoyo en la edición de los diversos documentos en inglés, por su paciencia, entusiasmo y estar siempre pendiente de mi bienestar incluso cuando estaba fuera del CIBNOR.

Al personal del Laboratorio de Histología e Histoquímica (Carmen Rodríguez) por las facilidades otorgadas en las preparaciones y análisis de muestras histológicas del trabajo.

A Pablo Monsalvo del Laboratorio de Aclimatación y Mantenimiento de Organismos Acuáticos por su gran ayuda en el asesoramiento y manejo de los ostiones.

Al personal del Laboratorio de Biología Reproductiva de Organismos Acuáticos (Marcos Quiñonez) por su ayuda en la medición de parámetros fisicoquímicos del agua durante los experimentos.

Al personal general de Posgrado (Horacio Sandoval, Edgar Yuen y Manuel Melero) por el apoyo técnico para la presentación de seminarios, avances de tesis y examen predoctoral.

Al técnico responsable del Laboratorio de Genética Molecular, la M en C. Delia Rojas, por su apoyo en el laboratorio durante el desarrollo de esta tesis.

A la Academia de Biotecnología por sus recomendaciones acerca del trabajo.

A mis compañeros y amigos por compartir momentos de reflexión, carnes asadas, días de playa etc (Reyna, Manuel, Luis, Edgar, Cynthia, Dr. Choix, Oscar y Angélica) y amigos que me han acompañado en la distancia (Alejandro, Seth, Gloria y Lúlu).

Por último, agradezco a mis padres (Cristina y Francisco) y a mis hermanos (Flor, July, Javier y Saúl) que siempre están incondicionalmente para escucharme y apoyarme en todo momento.

CONTENIDO	Página
Resumen	iii
Dedicatoria	V
Agradecimientos	Vi
Lista de Figuras	Xii
Lista de Tablas	Xvi
1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- ANTECEDENTES	4
2.1 Generalidades de eventos de mareas rojas	4
2.2 Generalidades y estructura de toxinas PST.	6
2.3 Mecanismos de acción de las toxinas PST.	7
2.4 Presencia y bioacumulación de toxinas (PST) en moluscos bivalvos.	8
2.5 Generalidades de <i>Crassostrea gigas</i> .	12
2.6 Respuesta bioquímica y molecular a ficotoxinas en <i>C. gigas</i>	14
3.- JUSTIFICACIÓN	20
4.- OBJETIVOS	22
4.1 Objetivo general	22
4.2 Objetivos particulares	22
5.- HIPÓTESIS	23
6.- MATERIAL Y MÉTODOS	23
6.1 Descripción de las microalgas utilizadas en los bioensayos	23
6.1.1 <i>Isochrysis galbana</i>	23
6.1.2 <i>Gymnodinium catenatum</i>	24
6.2 Cultivo y cosecha del dinoflagelado	25
6.3 Bioensayos con juveniles de <i>C. gigas</i> (3 ± 1 mm)	26
6.3.1 Diseño experimental	26
6.4 Bioensayos con juveniles de <i>C. gigas</i> (50 ± 10 mm)	29
6.4.1 Diseño experimental	29
6.5 Extracción de ARN total y síntesis de ADN complementario (ADNc)	31
6.6 Diseño de oligonucleótidos para RT-PCR	32
6.7 Estandarización de las curvas de saturación y análisis de expresión mediante RT-PCR	34
6.8 Diseño de oligonucleótidos para qPCR	35
6.9 Estandarización de las condiciones para RT-qPCR	38
6.10 Determinación de la estabilidad de los genes de referencia candidatos para juveniles talla pequeña (3 ± 1 mm) de <i>C. gigas</i> .	39
6.11 Análisis cuantitativo de la expresión génica.	42
6.12 Determinación de la estabilidad de los genes de referencia candidatos tejido-específico (glándula digestiva y hemocitos) en juveniles (50 ± 10 mm) de <i>C. gigas</i> .	43
6.13 Análisis histológico en juveniles de <i>C. gigas</i> (3 ± 1 mm) y (50 ± 10 mm)	44
6.14 Análisis estadísticos	45
7.- RESULTADOS	47
7.1 Curva de crecimiento de <i>G. catenatum</i>	47
7.2 Observaciones generales del bioensayo con ostiones juveniles.	47

7.2.1 <i>C. gigas</i> de 3 ± 1 mm	47
7.2.2 <i>C. gigas</i> de 50 ± 10 mm	49
7.3 Tasa de aclaramiento (TA) de <i>C. gigas</i>	50
7.3.1 TA de ostiones de 3 ± 1 mm	50
7.3.2 TA de ostiones de 50 ± 10 mm	52
7.4 Extracción de ARN total	54
7.5 Estandarización de las curvas de saturación y análisis de la expresión mediante RT-PCR	56
7.6 Estandarización de la eficiencia de amplificación	58
7.7 Determinación de la estabilidad de los genes de referencia candidatos en juveniles de 3 ± 1 mm de <i>C. gigas</i>	60
7.7.1 Análisis GeNorm	61
7.7.2 Análisis NormFinder	62
7.7.3 Análisis BestKeeper	63
7.8 Análisis cuantitativo de la expresión de genes de respuesta a estrés, defensa antioxidante, sistema inmune y detoxificación celular en juveniles de 3 ± 1 mm de <i>C. gigas</i>	66
7.8.1 Bioensayo de exposición aguda con ostiones juveniles de 3 ± 1 mm de talla	67
7.8.2 Bioensayo de exposición subcrónica con ostiones juveniles de 3 ± 1 mm de talla	70
7.9 Análisis cuantitativo de la expresión de genes involucrados en la regulación celular, citoesqueleto, inflamación, apoptosis, cadena respiratoria y regulación proteica de juveniles de 3 ± 1 mm de <i>C. gigas</i> .	73
7.9.1 Genes del ciclo celular.	73
7.9.2 Genes del citoesqueleto y procesos inflamatorios.	76
7.9.3 Gen de citocromo oxidasa I (<i>coi</i>) y gen de tripsina (<i>trp</i>).	78
7.10 Determinación de la estabilidad de los genes de referencia candidatos en glándula digestiva y hemocitos en juveniles de 50 ± 10 mm de <i>C. gigas</i>	80
7.10.1 Análisis GeNorm	80
7.10.2 Análisis BestKeeper	81
7.10.3 Análisis NormFinder	81
7.11 Análisis cuantitativo de genes de regulación del ciclo celular, citoesqueleto, inflamación, apoptosis y detoxificación en glándula digestiva de juveniles de 50 ± 10 mm de <i>C. gigas</i>	84
7.11.1 Genes de regulación del ciclo celular.	84
7.11.2 Genes involucrados en procesos inflamatorios y el citoesqueleto.	87
7.12 Análisis cuantitativo de genes relacionados con la respuesta inmune en hemocitos de juveniles de 50 ± 10 mm de <i>C. gigas</i>	88
7.13 Análisis histológico en juveniles de <i>C. gigas</i> (3 ± 1 mm)	91
7.13.1 Glándula digestiva	91
7.13.2 Músculo, Manto y Branquia	92
7.14 Análisis histológico en juveniles de <i>C. gigas</i> 50 ± 10 mm	95
7.14.1 Glándula digestiva y otros tejidos	95

8.- DISCUSIÓN	95
8.1 Observaciones en el comportamiento alimenticio y tasas de aclaramiento en <i>Crassostrea gigas</i>	98
8.2 Efecto de <i>G. catenatum</i> en la expresión de genes de respuesta a estrés, defensa antioxidante, sistema inmune y detoxificación celular en <i>C. gigas</i> (3 ± 1 mm)	101
8.3 Efecto de <i>G. catenatum</i> en la expresión de genes de regulación del ciclo celular, citoesqueleto, inflamación apoptosis y cadena respiratoria en <i>C. gigas</i> (3 ± 1 mm)	112
8.4 Efecto de <i>G. catenatum</i> en la expresión de genes de regulación del ciclo celular, citoesqueleto, inflamación y apoptosis en glándula digestiva de <i>C. gigas</i> (50 ± 10 mm)	122
8.5 Efecto de <i>G. catenatum</i> en la expresión de genes de respuesta inmune en hemocitos de <i>C. gigas</i> (50 ± 10 mm)	123
8.6 Daños histológicos en <i>C. gigas</i> de 3 ± 1 mm y 50 ± 10 mm por el efecto de la presencia de <i>G. catenatum</i> .	128
9.- CONCLUSIONES	133
10.- REFERENCIAS	137
11.- ANEXOS	147

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Parámetros de crecimiento de <i>G. catenatum</i> (en medio f/2 + Se, a 22 °C 35 ups y 150 $\mu\text{Em}^2\text{s}^{-1}$). Panel a , curva de crecimiento; panel b , tasa de crecimiento (divisiones/día).	47
Figura 2. Juveniles de <i>C. gigas</i> de 3 ± 1 mm alimentados con <i>I. galbana</i> control negativo a toxinas PST (0.75×10^5 cel mL^{-1}) (a), con <i>G. catenatum</i> control positivo a toxinas PST (3×10^3 cel mL^{-1}) (b), con dieta mixta <i>I. galbana</i> + <i>G. catenatum</i> 3×10^3 cel mL^{-1} (c), con dieta mixta <i>I. galbana</i> + <i>G. catenatum</i> 30×10^3 cel mL^{-1} (d).	49
Figura 3. Tasa de aclaramiento (TA) de <i>C. gigas</i> de 3 ± 1 mm durante 24 h. Control negativo, <i>I. galbana</i> 0.75×10^6 cel mL^{-1} ; Control positivo, <i>G. catenatum</i> 3×10^3 cel mL^{-1} . Tratamientos: dieta mixta <i>I. galbana</i> (0.75×10^6 cel mL^{-1}) y <i>G. catenatum</i> (3×10^3 cel mL^{-1}); dieta mixta <i>I. galbana</i> (0.75×10^6 cel mL^{-1}) y <i>G. catenatum</i> (30×10^3 cel mL^{-1})	52
Figura 4. Tasa de aclaramiento (TA) de <i>C. gigas</i> de 50 ± 10 mm durante 24 h. Control negativo, <i>I. galbana</i> (2×10^6 cel mL^{-1}); Control positivo, <i>G. catenatum</i> (6×10^3 cel mL^{-1}); dieta mixta <i>I. galbana</i> (2×10^6 cel mL^{-1}) + <i>G. catenatum</i> (6×10^3 cel mL^{-1}).	53
Figura 5. Perfil electroforético en gel de agarosa al 1% con TBE 1X de muestras de ARN total obtenidas mediante el método AGPC. Líneas: 1, marcador de peso molecular (1 Kb plus Ladder); 2-15 muestras de ARN total del bioensayo de exposición aguda de <i>C. gigas</i> a <i>G. catenatum</i> aleatoriamente seleccionadas. Técnica de tinción: EtBr; condiciones de separación, 80 V, 45 min.	55
Figura 6. Perfil electroforético en gel de agarosa/Synergel al 1% en TBE 1X de productos de PCR del gen 28S ARNr obtenidos en la prueba de identificación de contaminación con ADN del ARN de <i>C. gigas</i> extraído mediante el método AGPC. Líneas: 1, marcador de peso molecular (1 Kb plus Ladder) 2, control negativo (sin templado); 3, control positivo ADNc de <i>C. gigas</i> ; 4-7, muestras de ARN total. Técnica de tinción: EtBr; condiciones de separación, 80 V/45 min.	56
Figura 7. Perfil electroforético en gel de agarosa/Synergel® TBE al 1% de amplicones obtenidos en experimentos de saturación de PCR punto final para la evaluación de oligonucleótidos gen-específicos. Líneas: 1, marcador de peso molecular (1 Kb plus Ladder, Invotrogen); 2, (control negativo, sin templado); 20-50, ciclos de amplificación. Paneles: a, tubulina- β ; b, 28S ARNr ribosomal; c, superóxido dismutasa tipo cobre/zinc. Técnica de tinción: EtBr; condiciones de separación, 80 V/1 h.	57
Figura 8. Curva estándar para el gen de referencia candidato actina (<i>act</i>), a) valor umbral y eficiencia de amplificación, b) regresión lineal, c) curva de fluorescencia y d) curva de disociación.	59

- Figura 9.** Curva estándar para el gen blanco *lps-β 1,3 glucano (lgbp)* **a)** valor umbral y eficiencia de amplificación, **b)** regresión lineal, **c)** curva de fluorescencia y **d)** curva de disociación 59
- Figura 10.** Curvas de disociación de **(a)** *tub β*, **(b)** *efl-a*, **(c)** *act*, **(d)** *gapdh* y **(e)** *28s ARNr*. 60
- Figura 11.** Promedio de la estabilidad de la expresión génica (M) de genes candidatos de referencia en *C. gigas* de 3 ± 1 mm calculados con el software GeNorm. El valor de M bajo indica la media de los genes más estables (n = 18). 63
- Figura 12.** Determinación del número óptimo de genes de referencia para la normalización de análisis de la variación pareada (V) utilizando software GeNorm. Los valores indican la magnitud del cambio en el factor de normalización después de la inclusión de un gen de referencia adicional (n = 18). 64
- Figura 13.** Promedio de la estabilidad de la expresión génica de genes candidatos de referencia, en *C. gigas* de 3 ± 1 mm calculados con GeNorm **(a)**, BestKeeper **(b)** y NormFinder **(c)** (n = 18). 65
- Figura 14.** Análisis de la expresión relativa (qPCR) de los genes: **a)** superóxido dismutasa cobre/zinc (*sod-cu/zn*), **b)** glutatión S transferasa (*gst-s*), **(c)** glutamina sintetasa (*gs*), **d)** proteína de unión a LPS y β-glucanos (*lgbp*), y **e)** del citocromo P450 isoforma *cpy356A1*. Los valores de expresión se muestran como expresión normalizada respecto a los genes de referencia *28s ARNr* y *gapdh* y relativo al calibrador (línea punteada). Las barras representan la desviación estándar (SD), mientras los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos y el control negativo (*p<0.05, **p=0.001; HSD de Fisher). 69
- Figura 15.** Análisis de la expresión relativa (qPCR) de los genes: **a)** superóxido dismutasa cobre/zinc (*sod-cu/zn*), **b)** glutatión S transferasa (*gst-s*), **c)** glutamina sintetasa (*gs*), **d)** proteína de unión a LPS y β-glucanos (*lgbp*), y **e)** del citocromo P450 isoforma *cpy356A1*. Los valores de expresión se muestran como expresión normalizada con los genes de referencia *28s ARNr* y *gapdh* y relativo al calibrador (línea punteada). Las barras representan la desviación estándar (SD), mientras que los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos y el control negativo (*p<0.05, **p=0.001; HSD de Fisher). 72
- Figura 16.** Análisis de la expresión relativa (qPCR) de los genes de *C. gigas* bajo exposición subcrónica a *G. catenatum*. Paneles: **a)** Factor 1 de ensamblaje de cromatina subunidad p55 (*p55*), **b)** Proteína p21 reguladora del ciclo celular (*p21*), **c)** Factor de elongación 2 (*ef2*), **d)** Proteína p53 (*p53*). Los valores de expresión se muestran como expresión normalizada con los genes de referencia *28S ARNr* y *gapdh* y relativo al calibrador (línea punteada). Las barras representan la desviación estándar (SD) y los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos y el control negativo (*p < 0.05, **p = 0.001; HSD de Fisher). 76

- Figura 17.** Análisis de la expresión relativa (qPCR) de los genes de *C. gigas* relacionados con el citoesqueleto y sistema inmune, bajo exposición a *G. catenatum*. Paneles: **a)** Actina (*act*); **b)** Tubulina β (*tub \beta*), **c)** Caspasa 1 (*caspl*). Los valores de expresión se muestran como expresión normalizada con los genes de referencia 28S ARNr y *gapdh* y relativo al calibrador (línea punteada). Las barras representan la desviación estándar (SD) y los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos y el control negativo (* $p < 0.05$, ** $p = 0.001$; HSD de Fisher). 78
- Figura 18.** Análisis de la expresión relativa (qPCR) de los genes *C. gigas* relacionados con la cadena respiratoria y la regulación proteica, bajo exposición a *G. catenatum*. Paneles: **a)** citocromo oxidasa I (*coi*), **b)** tripsina (*tryp*). Los valores de expresión se muestran como expresión normalizada con los genes de referencia 28s ARNr y *gapdh* y relativo al calibrador (línea de puntos). Las barras representan la desviación estándar (SD), los asterisco indican diferencias significativas entre los tratamientos y el control negativo (* $p < 0.05$, ** $p = 0.001$; HSD de Fisher). 79
- Figura 19.** Promedio de la estabilidad de la expresión de genes candidatos de referencia en glándula digestiva de *C. gigas* calculados con los softwares GeNorm (a), BestKeeper (b) y NormFinder (c) ($n = 18$). 83
- Figura 20.** Análisis de la expresión relativa (qPCR) de los genes de *C. gigas* relacionados con la regulación del ciclo celular en glándula digestiva, bajo exposición subcrónica a *G. catenatum*. Paneles: a) Proteína p21 reguladora del ciclo celular (*p21*); b) Proteína p53 (*p53*); c) Factor 1 de ensamblaje de cromatina subunidad p55 (*cafp55*); d) Factor de elongación 2 (*ef2*). Los valores de expresión se muestran como expresión normalizada con genes de referencia *gapdh*, *ef1- α* y *tub β* y relativo al calibrador (línea de puntos). Las barras representan la desviación estándar (SD) mientras que el asterisco indica diferencias significativas entre los tratamientos y el control no toxico (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$; HSD de Fisher). 86
- Figura 21.** Análisis de la expresión relativa (qPCR) de los genes de *C. gigas* relacionados con la regulación del ciclo celular y citoesqueleto en glándula digestiva, bajo exposición subcrónica a *G. catenatum*. Paneles: **a)** Actina (*act*), **b)** Caspasa 1 (*caspl*). Los valores de expresión se muestran como expresión normalizada con los genes de referencia *gapdh*, *ef1- α* y *tub β* (genes de referencia) y relativo al calibrador (línea de puntos). Las barras representan la desviación estándar (SD) y los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos y el control negativo (* $p < 0.05$, ** $p = 0.001$; HSD de Fisher). 86
- Figura 22.** Análisis de la expresión relativa (qPCR) de los genes de *C. gigas* de genes relacionados con la respuesta inmune en hemocitos de *C. gigas*, bajo exposición subcrónica a *G. catenatum*. Paneles: **a)** Proteína de unión a LPS y β -1,3glucano (*lgbp*); **b)** Proteína inducida por interferón 44 (*if44*); **c)** Cavortina (*cvt*); **d)** Proteína de shock térmico HSP70 (*hsp70*). Los valores de expresión se muestran como expresión normalizada con los genes de referencia *gapdh*, 28s ARNr y *ef1- α* y relativo al calibrador (línea de puntos). 90

Las barras representan la desviación estándar (SD) mientras que los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos y el control negativo (* $p < 0.05$, ** $p = 0.001$; HSD de Fisher).

Figura 23. Corte transversal de los túbulos de la glándula digestiva de juveniles de *C. gigas* de 3 ± 1 mm, expuesto a *G. catenatum* teñidas con hematoxilina-eosina. **a)** organismo control alimentados con *I. galbana* (0.75×10^6 cel mL^{-1}); **(b)** control toxico *G. catenatum* (3×10^3 cel mL^{-1}) **(c)** dieta mixta *I. galbana* (0.75×10^6 cel mL^{-1}) + *G. catenatum* (3×10^3 cel mL^{-1}); **(d)** dieta mixta *I. galbana* (0.75×10^6 cel mL^{-1}) + *G. catenatum* (30×10^3 cel mL^{-1}) (Microscopio olympus BX41, 100 X). 92

Figura 24. Cortes de diferentes tejidos en juveniles de *C. gigas* de 3 ± 1 mm, expuesto a *G. catenatum* teñidas con hematoxilina-eosina. Musculo estriado **a)** organismo control alimentados con *I. galbana* (0.75×10^6 cel mL^{-1}); **(b)** dieta mixta *I. galbana* + *G. catenatum* (30×10^3 cel mL^{-1}). Branquia **c)** organismo control alimentados con *I. galbana* (0.75×10^6 cel mL^{-1}); **(d)** dieta mixta *I. galbana* + *G. catenatum* (30×10^3 cel mL^{-1}). Manto **e)** organismo control alimentados con *I. galbana* (0.75×10^6 cel mL^{-1}); **(f)** dieta mixta *I. galbana* + *G. catenatum* (30×10^3 cel mL^{-1}) (Microscopio olympus BX41, a 100 X). 94

Figura 25. Histopatología del intestino de *C. gigas* de 50 ± 10 mm de talla, teñidas con hematoxilina-eosina. **Glándula digestiva (a)** organismo control alimentados con *I. galbana* (2×10^6 cel mL^{-1}); **(b)** y **(c)** organismo alimentados con *I. galbana* 2×10^6 cel mL^{-1} y *G. catenatum* 6×10^3 cel mL^{-1} ; **intestino (d)** organismo control alimentados con *I. galbana* (2×10^6 cel mL^{-1}); **(e)** y **(f)** organismo alimentados con *I. galbana* 2×10^6 cel mL^{-1} y *G. catenatum* 6×10^3 cel mL^{-1} ; **branquia (g)** organismo control alimentados con *I. galbana* (2×10^6 cel mL^{-1}); **(h)** organismo alimentados con *I. galbana* 2×10^6 cel mL^{-1} y *G. catenatum* 6×10^3 cel mL^{-1} ; **Manto (i)** organismo control alimentados con *I. galbana* (2×10^6 cel mL^{-1}); **(j)** organismo alimentados con *I. galbana* 2×10^6 cel mL^{-1} y *G. catenatum* 6×10^3 cel mL^{-1} . Microscopio olympus BX41, a 40 X y 100 X (c y f). 97

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla I. Relación de genes estudiados y su función bioquímica	18
Tabla II. Diseño experimental del bioensayo de exposición de <i>C. gigas</i> (3 ± 1 mm) a <i>G. catenatum</i> .	28
Tabla III. Relación de genes, números de acceso a GenBank de secuencias de cDNA de <i>C. gigas</i> utilizados para el diseño de <i>primers</i> para RT-PCR.	33
Tabla IV. Relación y características generales de oligonucleótidos diseñados para análisis de RT-qPCR (* genes candidatos).	37
Tabla V. Concentraciones de ADNc probadas para las curvas estándar.	39
Tabla VI. Criterios de evaluación de las metodologías de extracción de ARN total probadas.	54
Tabla VII. Concentración y pureza del ARN total de las muestras obtenidas del bioensayo de exposición aguda de <i>C. gigas</i> a <i>G. catenatum</i> .	55
Tabla VIII. Análisis de estabilidad de los genes de referencia en hemocitos de <i>C. gigas</i>	84

1. INTRODUCCIÓN

En el ambiente marino, la presencia de Floraciones Algales Nocivas (FAN), coloquialmente conocidas como “marea roja”, causa grandes mortandades a través de las diferentes redes tróficas. Los problemas sobre el efecto de los FAN no son exclusivos de organismos marinos en su medio natural, sino también se han reportado casos en granjas de cultivo como las granjas ostrícolas de las costas de California, Oregón y Washington (en E.U.A.), y en las costas mexicanas de Sonora y Baja California, donde se registraron mortandades de hasta el 90%. Problemas similares se presentaron en la granja ostrícola SOL AZUL, ubicada en el estero El Cardón (San Ignacio, B.C.S.) durante Febrero, Mayo y Octubre de 1998, donde los organismos mayormente afectados fueron las larvas fijadoras (semillas) de *Crassostrea gigas*.

Es bien sabido que las toxinas paralizantes o Paralytic Shellfish Poisoning (PST, por sus siglas en inglés) pueden acumularse en los tejidos de los moluscos bivalvos a través de los procesos de alimentación. Por ello, se han realizado varios estudios enfocados a observar el efecto de la ingesta de dinoflagelados productores de dichas toxinas, que abarcan desde comportamiento alimenticio (Bricelj y Shumway, 1998; Bougrier et al., 1997; Wilsh et al., 1998, Hegaret et al., 2007), la cinética de acumulación (Laabir et al., 2007) y los mecanismos de depuración (Guégen et al., 2008) hasta los daños tisulares (Hegaret et al., 2007; Haberkorn et al., 2010 a,b). Sin embargo, aún no ha sido posible establecer una relación directa causa-efecto entre la mortandad de moluscos y la presencia de eventos de

marea roja; en virtud de que las mortandades ocurrieron en zonas de cultivo, es imperativo estudiar el efecto de estas toxinas a nivel fisiológico y molecular.

Con base a lo anterior, en el presente estudio se planteó realizar el análisis de los efectos de la exposición de juveniles de ostión *C. gigas* (dos tallas) al dinoflagelado tóxico *Gymnodinium catenatum*. En la primera parte de este estudio se utilizaron juveniles de ostión de 3 ± 1 mm de talla, porque en este estadio son más vulnerables a cualquier tipo de estrés y es la talla que utilizan para la siembra en el sector acuícola, por lo que cualquier impacto negativo afecta directamente al sector económico.

Se monitoreó el nivel de expresión de genes involucrados en diferentes vías metabólicas en dos escenarios de exposición: una exposición de fase aguda (24 h de duración) y una de fase subcrónica (durante 14 d), en las que se probaron dos concentraciones del dinoflagelado tóxico (3×10^3 y 30×10^3 cel mL⁻¹) en dietas mixtas con *Isochrysis galbana*, incluyendo un control positivo a toxinas PST ó control tóxico (el dinoflagelado en dieta unialgal) y un control negativo a toxinas PST ó control no tóxico (*I. galbana*). Para el análisis de la expresión génica se realizó un tamizado preliminar mediante la técnica de RT-PCR al determinar semicuantitativamente la expresión de 25 genes involucrados en siete procesos metabólicos (proteínas de respuesta generalizada a estrés, cadena respiratoria, regulación de ácidos nucleicos, comunicación celular, genes de respuesta inmune, de citoesqueleto, regulación proteica y metabolismo energético). Con base en esos resultados, se realizó una selección de los genes potencialmente regulados (en términos de

sobreexpresión o subexpresión) a los que se le determinó la tasa de expresión mediante la técnica de RT-qPCR.

En la segunda parte de la investigación, se utilizaron ostiones de 50 ± 10 mm de talla. Se probó sólo una concentración del dinoflagelado tóxico (6×10^3 cel mL⁻¹) basada en registros de la concentración máxima observada en eventos naturales) en una dieta mixta con *I. galbana*, un control positivo a toxinas PST (6×10^3 cel mL⁻¹), dieta unialgal con *G. catenatum*) y un control no tóxico (*I. galbana*), por un periodo de 7 días (exposición a mediano plazo). Se realizaron análisis de la expresión génica (RT-qPCR) principalmente en: 1) glándula digestiva, por ser el órgano blanco para la acumulación de toxinas, considerando genes involucrados en la regulación del ciclo celular, inflamación, apoptosis y citoesqueleto; 2) en hemocitos se analizaron genes involucrados en respuesta inmune debido a que la principal función de estas células es la defensa contra agentes dañinos. Finalmente, se realizaron análisis histológicos en muestras de los ostiones de ambas tallas con el fin de identificar y caracterizar los cambios promovidos por la ingesta del dinoflagelado toxico a nivel tisular.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de eventos de mareas rojas.

El fitoplancton, que comprende al conjunto de organismos acuáticos autótrofos del plancton que tienen capacidad fotosintética y que viven en la columna de agua, es un alimento esencial para los organismos filtradores, especialmente los moluscos bivalvos (ostiones, ostras, mejillones y almejas). Ciertas condiciones (combinación de factores físicos, químicos y biológicos) como por ejemplo una situación de exceso de nutrientes y/o temperatura favorable, pueden provocar que el fitoplancton se multiplique formando lo que se suele llamarse un florecimiento (*bloom*, por su traducción al idioma inglés), marea roja o floraciones masivas. Cuando se presentan estos eventos y ocasionan efectos negativos son denominados “Florecimientos Algales Nocivos” (FAN), y pueden clasificarse como:

- Inocuos: son aquellos en los que las especies que forman el FAN producen cambios en la coloración de las masas de agua, siendo totalmente inofensivas; de hecho, en muchas ocasiones son benéficas y responsables de la alta productividad primaria de ciertas regiones costeras.
- Nocivos: las especies del fitoplancton florecen tan densamente que matan indiscriminadamente peces e invertebrados (especialmente en sistemas de cultivo intensivo) al agotar el oxígeno, disminuir el paso de la irradiación solar y dañando sus branquias.

- Tóxicos: las especies que conforman los FAN (generalmente dinoflagelados, diatomeas o cianobacterias) producen toxinas, que se incorporan rápidamente en las cadenas tróficas; este tipo de florecimientos no está necesariamente asociado a cambios evidentes en la coloración de los cuerpos de agua. Se han descrito 300 especies tóxicas entre ellas *Gymnodinium catenatum*.

De esta forma las toxinas pueden llegar a los consumidores finales, por ejemplo, en 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)

Por tanto, los FAN pueden tener efectos negativos causando pérdidas económicas para la acuicultura, pesquerías y turismo (Burgess y Shaw, 2001), con su consecuente impacto negativo al ambiente y la salud humana (Hallegraeff, 1995; Andersen, 2004; Matsuyama y Shumway, 2009).

El impacto de los FAN sobre los moluscos bivalvos en las costas de México es un hecho que se ha observado cada vez con mayor frecuencia (Cortés-Altamirano et al., 1998b). En la región Noroeste de México, particularmente la Costa Occidental de la península de

B.C.S. y Golfo de Baja California, es común que estacionalmente se presenten eventos FAN (Lechuga-Devéze y Morquecho-Escamilla 1998). Cortés-Altamirano et al. (1998b), definen la época de mayor incidencia de mareas rojas de Febrero a Mayo (observándose en Abril las mareas rojas más tóxicas, particularmente para la costa este del Golfo de California (Ochoa et al., 1997; Sierra Beltrán et al., 1998). En la región de Baja California Sur las especies que han sido reportadas con mayor frecuencia son: *Gymnodinium catenatum*, *Akashiwa sanguinea*, *Noctiluca scintillans*, *Gonyaulax polyedra*, *Prorocentrum dentatum*, *Porocentrum minimum* y *Pseudo-nitzschia australis* (Cortés et al., 1998b).

En la mayoría de los países se considera a las toxinas PST como un grupo, con límites establecidos en 400 UR/100 g o 80 µg eq de STX/100 g de carne; en México el límite reglamentario es de 30 µg eq de STX/100 g (Aune, 2001).

2.2 Generalidades y estructura de las toxinas PST.

Las toxinas paralizantes o PST (son neurotoxinas, producidas por diversas especies de dinoflagelados de zonas tropicales o templadas, principalmente de los géneros: *Alexandrium*, *Gymnodinium* y *Pyrodinium* (Bricelj y Shumway, 1998; FAO, 2005). Las toxinas paralizantes PST o PSP (por sus siglas en inglés, Paralytic Shellfish Poisson) reciben este nombre porque en el humano, al ingerir bivalvos contaminados, provocan parálisis muscular y, en casos graves, la muerte (Bricelj y Shumway, 1998). Los síntomas descritos van desde un leve entumecimiento o picazón, hasta parálisis respiratoria completa, que en casos fatales, ocurre entre dos y doce horas después de la ingestión (FAO, 2005). Los bivalvos que se alimentan de estos dinoflagelados acumulan las toxinas sin

sufrir efectos nocivos aparentes; la tasa de acumulación y depuración de estas toxinas varía ampliamente según la especie (Blanco et al., 2003), sin embargo, la transmisión de estas fitotoxinas a humanos y a otros organismos consumidores se da a través de las redes tróficas (Bricelj y Shumway, 1998).

Se han descrito aproximadamente 21 formas moleculares de toxinas tipo PST que han sido aisladas de dinoflagelados tales como: *Alexandrium catenella*, *G. catenatum* y *Pyrodinium bahamense var. compressum* (Yasumoto et al., 1995). Las toxinas PST se dividen en cuatro subgrupos: 1) el grupo carbamato que incluye: STX, neoSTX y las goniautoxinas GNTX 1-4); 2) las del grupo N-sulfo-carbamoil: GNTX 5-6 y C1-4); 3) el grupo decarbamoil (dc-): dcSTX, dcneoSTX y dcGNTX1-4) y, finalmente, el grupo 4) compuestos de desoxidecarbamoil (do): doSTX, doneoSTX y doGNTX 1); su toxicidad varía ampliamente, siendo más tóxicas las del grupo carbamato (FAO, 2005; Kodama 2010). La saxitoxina (STX), fue el primer compuesto marino cuyo origen se asoció al fitoplancton (Shimizu, 1993).

2.3 Mecanismos de acción de las toxinas PST.

La toxinas PST bloquean selectivamente, y con mucha afinidad, el canal de sodio dependiente del voltaje. Este canal, consiste de una proteína de aproximadamente 250 kDa, que atraviesa la membrana plasmática de muchas células excitables; se caracteriza por una conducción uniforme, depende del potencial y presenta selectividad iónica. Esta proteína se encuentra en los nervios de los mamíferos, en las fibras del músculo esquelético y en la mayoría de las fibras del músculo cardíaco. 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 el desplazamiento del ion Na^+ de la fase extracelular hacia el interior de la célula, mediante fuerzas electroquímicas; el flujo de sodio hacia el interior 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 K^+ intracelular hacia afuera, con la consecuente re-polarización. La STX, y varias otras toxinas del tipo PST, bloquean el canal de sodio dependiente del voltaje con mucha potencia, haciendo más lento o anulando la propagación del potencial de acción, pero sin afectar el canal de potasio (FAO, 2005). Se ha observado que 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; Kodama, 2010).

2.4 Presencia y bioacumulación de toxinas (PST) en moluscos bivalvos.

En moluscos bivalvos, el proceso de filtración transporta las células y los quistes de los dinoflagelados al tracto digestivo. La digestión, que ocurre en el estómago y en los divertículos, es el proceso mediante el cual las toxinas PST se liberan y entran a los órganos digestivos. El sistema digestivo de los moluscos bivalvos posee varias estructuras anatómicas, siendo una de las más importantes la glándula digestiva. Anatómicamente se conecta al estómago y físicamente la glándula recubre en su totalidad al estómago conectándose posteriormente al tubo digestivo (Gosling, 2003). La glándula digestiva está involucrada en el almacenamiento de azúcares y lípidos; estas reservas energéticas son movilizadas durante los procesos de gametogénesis o utilizadas en los eventos de estrés

ambiental. Por la función endocítica de sus células, la glándula digestiva resulta ser el principal sitio de acumulación de compuestos tóxicos (Gosling, 2003). La mezcla de toxinas que se aloja en los tejidos del molusco varía según el tipo, cepa y/o especie del dinoflagelado en cuestión, así como la concentración de toxinas varía con el tiempo y las condiciones ambientales. Se ha observado que el 96% de la toxicidad total se encuentra en las vísceras, que constituyen alrededor del 30% del peso total de tejido. Particularmente en almejas, la toxina se acumula rápidamente en las vísceras, disminuyendo gradualmente. Sin embargo, después de un periodo de latencia de cuatro semanas o más, las toxinas han llegado a detectarse en el sifón (Mons et al., 1998).

En los diferentes tejidos de algunos moluscos como las vieiras, se ha estudiado la toxicidad observándose en general que: 1) el músculo aductor casi no acumula toxinas, 2) la glándula digestiva, manto, gónada y branquias, retienen toxinas y 3) la toxicidad varía de acuerdo a la estación del año (Bricelj y Shumway, 1998). Una vez absorbidas y distribuidas, las toxinas pueden biotransformarse aumentando en ocasiones su toxicidad para los mamíferos, entre ellos el hombre (Mons et al., 1998; Choi et al., 2003).

En el laboratorio, algunos ensayos de alimentación han demostrado que los mejillones consumen rápidamente concentraciones de *Alexandrium* iguales o mayores que las que causan el cese del bombeo y el cierre de las valvas (Navarro et al., 2010). Los resultados de los estudios electrofisiológicos, con nervios aislados de bivalvos de la costa atlántica, muestran que los ostiones son sensibles a las toxinas, mientras que el mejillón es relativamente poco sensible (Mons et al., 1998). Blanco et al. (1997) estudiaron la cinética

de la eliminación de toxinas en el mejillón *Mitylus galloprovincialis* expuesto a una florecimiento de *G. catenatum* observando que el perfil de toxinas del molusco resulta ser muy similar al del dinoflagelado, lo que indica que (en este caso) la biotransformación tiene muy poca o ninguna importancia. En otros estudios Wildish et al. (1998) observaron que *C. gigas* alimentados con *Alexandrium tamarensis* y *Alexandrium fundyense*, tóxicos y no tóxicos, abren y cierran las valvas, lo que sugiere que las toxinas PST no están directamente involucradas en la inhibición de la respuesta inicial a la alimentación. En los ostiones control (alimentados con *Isochrysis* sp.) se observó un mayor crecimiento, en tanto que se obtuvieron evidencias adicionales en el comportamiento de apertura/cierre de las valvas, al alimentar ostiones previamente aclimatados con *Isochrysis* sp. con mezclas de *Alexandrium/Isochrysis*.

Lassus et al. (2000) estudiaron la eliminación de toxinas con un grupo de individuos adultos de *C. gigas* contaminados experimentalmente con toxinas PST (por exposición a *Alexandrium minutum*) en concentraciones entre 150 y 300 μg eq de STX/100 g, y alimentados con dietas de diatomeas o dinoflagelados no tóxicos. Si bien, se observó que la cantidad de toxinas varió de individuo en individuo, los autores determinaron que el tiempo de eliminación de toxinas se encuentra entre los tres y cuatro días, hasta alcanzar el umbral de seguridad de 80 μg /100 g. Las tasas de eliminación de distintos grupos de ostiones alimentados con *I. galbana*, *Tetraselmis suecica*, *Thalassiosira weissflogii* o con *Skeletonema costatum* no presentaron diferencias significativas. Los autores observaron que el perfil de toxinas durante el proceso de depuración está dominado por GNTX2 y GNTX3, mientras que los porcentajes de toxinas C fueron relativamente bajos, y la STX y

neoSTX no fueron detectables. El perfil de toxinas de los ostiones resulto ser igual al de *A. minutum* lo que sugiere que en el ostión no hay biotransformación. Laabir et al. (2007), observaron que *C. gigas*, produce heces y pseudoheces que contienen quistes intactos y viables cuando son alimentados con *A. catenella* y *A. minimum*. El contenido de las toxinas PST totales de las células germinadas de dichos quistes fue menor que en las células utilizadas como alimento. Por lo tanto, los autores concluyen que los quistes y las nuevas células germinadas representan una vía potencial de transferencia de las toxinas PSP a otros niveles tróficos.

Yan et al. (2001) estudiaron la inhibición de la eclosión y la supervivencia de las larvas de *Chlamys farreri* expuestas a distintas concentraciones de *A. tamarensis*. En huevos fértiles se registró solo un 30% de nacimientos y 5% en el grupo testigo con una exposición de 36 horas a células o fragmentos celulares de *A. tamarensis* en concentraciones de 100 y 500 cel mL⁻¹, respectivamente; no se observó respuesta inhibitoria exponiendo los huevos a STX o contenidos celulares. El alga también afectó las larvas en estadio D temprano de la vieira y se observó un considerable descenso en las tasas de supervivencia bajo exposición durante 6 días a concentraciones $>3 \times 10^3$ cel mL⁻¹, mientras que ninguna larva sobrevivió a una exposición de 14 días a concentraciones de 1×10^4 cel mL⁻¹. El estudio concluyó que los estadios de desarrollo previos a la blástula son los más sensibles a las toxinas de *A. tamarensis*.

2.5 Generalidades de *Crassostrea gigas*.

El ostión japonés u ostión del Pacífico es el nombre común utilizado para el molusco bivalvo *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). Esta es una especie, originaria de Japón, fue introducida a diferentes regiones del mundo gracias a su gran capacidad de tolerancia y adaptación a cambios en los factores bióticos y abióticos, y a su potencial de rápido crecimiento, por lo que actualmente es considerada una especie cosmopolita de gran importancia comercial. Además, es uno de los mejores modelos de estudio científico dentro del grupo de los bivalvos, porque son los principales bioindicadores de contaminación ambiental, además de sus estudios a nivel bioquímico, molecular (Saavedra y Bachére, 2006) y actualmente se tiene secuenciado su genoma completo (Zhang *et al.*, 2012).

C. gigas fue introducida en México a principios de los años setenta, y su cultivo se encuentra altamente desarrollado en la región Noroeste, particularmente en los estados de Baja California, Baja California Sur, Sonora, Sinaloa y Nayarit. La producción ostrícola en 2011 fue del orden de 3 955 t, con una tendencia al aumento. Actualmente a nivel mundial la producción de esta especie es una de las más importantes en la industria acuícola (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2013).

En cuanto a la anatomía interna, el cuerpo se encuentra envuelto por el manto, que está involucrado en la síntesis de la concha y en las funciones sensoriales, el organismo es capaz de presentar retracción ante estímulos nerviosos (Goslin *et al.*, 2003). 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 nutricia. 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) (Goslin, 2003).

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 bañan los órganos, y la hemolinfa es colectada posteriormente en senos venenosos para su paso a través de las branquias (FAO, 2006).

Para obtener su alimento, el ostión japonés hace pasar el agua a través de sus branquias, reteniendo la materia orgánica en su sistema digestivo. *C. gigas* 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 el alimento filtrado 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 (Goslin, 2003; Helm et al., 2006).

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 (Manduzio et al., 2005). 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),

2.6 Respuesta bioquímica y molecular a ficotoxinas en *C. gigas*

Se ha reportado que la exposición a estresores ambientales como contaminantes, metales pesados y microalgas tóxicas, podría requerir una mayor demanda energética para protección y reparación celular y procesos de destoxificación (Haberkorn et al., 2010). En particular, es bien conocido que la síntesis de proteínas se incrementa durante condiciones de estrés dadas por temperatura o contaminación, debido a la inducción de chaperonas moleculares tales como proteínas de estrés al calor y metalotioneinas. Adicionalmente, las células se protegen contra el peligro generado por el estrés oxidativo inducido también por estas condiciones de estrés, incrementando la producción de enzimas antioxidantes. Este incremento en la síntesis de proteínas, refleja una elevada actividad del proceso transcripcional ya que se han observado incremento en la abundancia de ARN (Boutet et al., 2003b).

Los procesos moleculares y rutas metabólicas involucrados en la respuesta celular a toxinas paralizantes son aún desconocidos, sin embargo, se ha reportado el efecto a nivel bioquímico y molecular de otras ficotoxinas en diferentes organismos. Estudios previos han documentado cambios en la expresión de genes o proteínas en el sistema nervioso central de ratas y peces como consecuencia de la exposición aguda al ácido domoico (toxina

producida por diatomeas de los generos *Nitzschia* y *Pseudo-nitzschia*), modificando la expresión de genes involucrados en la transducción de señal y la regulación de la transcripción (Salierno et al., 2006). Lefebvre et al. (2009) mencionan que los factores de transcripción son los primeros en responder ante una exposición al ácido domoico.

En moluscos, las bases moleculares y celulares de la respuesta a las toxinas fitoplanctónicas son poco conocidas. Recientemente, se ha descubierto que las diferencias respecto a la sensibilidad a la toxina paralizante (PST) entre poblaciones de la almeja americana *Mya arenaria* están relacionadas con el polimorfismo de un gen que codifica la subunidad de un canal de sodio (Bricelj et al., 2005). Este polimorfismo resulta en la sustitución de un residuo de ácido glutámico presente en la región del poro exterior del canal de los animales sensibles a la toxina, por el ácido aspártico presente en los organismos resistentes. Estrada et al. (2007) encontraron variación en la actividad de varias enzimas: superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa en *Nodipecten subnodosus* expuesto a *G. catenatum*; la actividad de catalasa y glutatión peroxidasa fue mayor en glándula digestiva, seguida de manto, branquia y músculo, mientras que la actividad de superóxido dismutasa disminuyó en branquia y músculo. También encontraron que la exposición a *G. catenatum* incrementa la actividad de tripsina, α -quimotripsina y α -galactosidasa.

Por su parte Haberkorn et al. (2010 a), observaron que una exposición de *C. gigas* a células de *A. minimum* produce incrementos significativos en la concentración de especies reactivas de oxígeno (EROs), la cual depende de la temporada de exposición y de la condición de ploidía de los organismos: en relación a la estación anual fue mayor en abril y

disminuyó significativamente en Mayo, y en relación a la ploídia esta fue mayor en organismos triploides; en cambio la actividad profenol oxidasa disminuyó significativamente en ambos tipos de organismos.

Sin embargo, los procesos moleculares y las vías metabólicas implicadas en la respuesta celular del ostión del Pacífico a la presencia de toxinas PST son poco conocidas a nivel transcripcional. Estudios recientes revelaron que los genes implicados en el metabolismo oxidativo y mitocondrial como la catalasa, glutatión peroxidasa y citocromo oxidasa C; en la inmunidad como interleucina 17; y en el proceso de desintoxicación (proteína de resistencia a múltiples fármacos) fueron reprimidos transcripcionalmente por la exposición a *A. minutum* (Mat et al., 2013). Núñez-Acuña et al. (2013) encontraron niveles de expresión génica diferencialmente alta de la superóxido dismutasa, catalasa, ferritina y proteína de choque térmico en la glándula digestiva de *Mytilus chilensis* expuestos a saxitoxina.

Por otra parte, algunos estudios indican que las toxinas marinas son genotóxicas y también pueden actuar como iniciadores de tumores (Wikfors, 2005; Landsberg, 2002; González-Romero et al, 2012). El estrés genotóxico desencadena una variedad de respuestas celulares, incluyendo la activación transcripcional de los genes que regulan la reparación del ADN, la detención del ciclo celular y la apoptosis (Mirzayans et al., 2012). González-Romero et al. (2012) reportaron que la remodelación de la cromatina desempeña un papel clave en la activación transcripcional de los factores reguladores en respuesta a una variedad de señales de estrés.

La respuesta de los organismos ante las toxinas depende de diversos factores, siendo los más importantes las propiedades específicas, físicas y químicas del compuesto y la concentración (Huvet et al., 2004). Una vez que ingresa la toxina al organismo, es absorbida y distribuida por el sistema circulatorio hasta llegar a las células blanco que son las que tienen los receptores (suele ser una proteína) para cada compuesto químico específico (Huvet et al., 2004). Cuando la concentración del compuesto tóxico dentro de la célula es grande, los receptores se saturan produciéndose una respuesta tóxica máxima, mientras que cuando la concentración es baja, la respuesta es menor (Denslow et al., 2007).

Las toxinas paralizantes son toxinas termoestables, altamente hidrofílicas y específicas a las células nerviosas, en las que bloquean los canales de sodio dependiente de voltaje. Por lo tanto, su característica hidrofílica no permite su paso a través de la membrana celular por lo que se unen de manera reversible al sitio 1 del canal de sodio, bloqueando el poro (FAO, 2005). Al no poder ingresar a la célula, las toxinas PST no pueden actuar de manera directa, sin embargo, el bloqueo puede funcionar como una señal extracelular para fosforilar o desfosforilar proteínas que se encuentran en la membrana, que a su vez actúan como segundos mensajeros, ocasionando así una cascada de respuestas alteradas a nivel celular, particularmente en la expresión de los genes.

En general, se ha descrito el comportamiento de los organismos expuestos a una sustancia tóxica y como ésta podría estar influenciando la expresión de genes. Durante las primeras horas, después de iniciada la exposición, se empiezan a dar los cambios en la expresión de genes: 1) En tiempos cortos o dosis bajas, los genes que son inducidos tienden a ser

adaptativos, protegiendo al organismo de la toxicidad (Denslow et al., 2007). En organismos expuestos a metales, y para una gran variedad de estresores como es el caso del presente trabajo, se ha observado la inducción de la expresión de genes que codifican proteínas de respuesta a estrés como las metalotioneinas y las proteínas de shock térmico (Jenny et al., 2002). 2) Al incrementarse la dosis, el organismo intenta compensar mediante la interrupción de ciertas vías metabólicas provocadas por la exposición, y nuevas vías metabólicas son activadas resultando en la expresión de un nuevo grupo de genes. Estos cambios son importantes para el organismo y diferentes de los involucrados en la adaptación, asociándose directamente con la adversidad provocada por el tóxico (Denslow et al., 2007).

En la tabla I, se describe la función de los genes que fueron monitoreados en el presente trabajo.

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

Nombre del gene	Función
Glutamina sintetasa (<i>gs</i>)	Esta enzima es esencial en el metabolismo del nitrógeno, cataliza la reacción química de glutamato y amonio para formar Glutamina (aminoácido con dos átomos de nitrógeno); su biosíntesis en el cuerpo ayuda a “limpiar” de amoníaco algunos tejidos.
Glutatión-S-transferasa (<i>gst-s</i>)	Familia de enzimas detoxificantes que catalizan la conjugación de glutatión reducido (a través del grupo sulfhidrilo) a centros electrofílicos en una amplia variedad de sustratos. Desintoxica, entre otros, lípidos peroxidados, puede enlazar toxinas y funcionar como transporte de proteínas.
Proteína de shock térmico 70 (<i>hsp70</i>)	Proteínas de shock térmico de 70kDa. Familia de proteínas (chaperonas) que protegen a las células del estrés térmico y oxidativo al evitar la pérdida de estructura de las proteínas mediante su unión temporal a las mismas a través de los residuos hidrofóbicos; impide la agregación y facilita el plegamiento.
Superóxido dismutasa tipo cobre-zinc (<i>sod- cu/zn</i>)	La enzima superóxido dismutasa (SOD) es una importante defensa antioxidante en la mayoría de las células expuestas a oxígeno, al protegerlas de las reacciones dañinas del radical superóxido dismutándolo a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno.
Citocromo oxidasa (<i>coi</i>)	Enzima óxido-reductasa que cataliza el último paso de la cadena de transporte electrónico, transfiere los electrones a moléculas de oxígeno y la reduce a 2H ₂ O.
Citocromo p450	Son un grupo grande y diverso de enzimas que generalmente constituyen la

(<i>cyp450</i>)	primera fase de desintoxicación clase I en los organismos. Estas enzimas, metabolizan una amplia variedad de sustratos, tales como ácidos grasos, hormonas y xenobióticos.
Tripsina (<i>trip</i>)	Es una enzima que hidroliza enlaces peptídicos en las proteínas para formar péptidos de menor tamaño y liberar aminoácidos.
Proteína p21 (<i>p21</i>)	Proteína reguladora del ciclo celular a nivel de la fase G1 cuando existe crecimiento celular con síntesis de proteínas y ARN.
Factor de ensamblaje de la cromatina (<i>cap55</i>)	Proteína que actúa en la acetilación de histonas (histona acetiltransferasa, HAT) y participa en la transcripción a través de la regulación epigenética de diferentes procesos celulares, de ensamblaje y maduración de la cromatina.
Proteína p53 (<i>p53</i>)	En los mamíferos la proteína p53 desempeña un papel central en la supervisión de la integridad del genoma, además de otras funciones importantes en la detención del ciclo celular, reparación del ADN, apoptosis y la carcinogénesis.
Factor de elongación 2 (<i>fe2</i>)	Es una enzima de la familia de las GTPasa que participa en la elongación durante la síntesis de proteína.
Caspasa 1 (<i>cp1</i>)	Pertenecen a una familia de cisteín-aspartato proteasas altamente específicas y conservadas; constituyen el núcleo de la maquinaria para la apoptosis celular.
Actina (<i>act</i>)	El citoesqueleto de actina es una red dinámica de polímeros de actina y gran variedad de proteínas asociadas. Sus principales funciones fisiológicas están relacionadas con la motilidad celular y los cambios de forma de la célula durante el ciclo celular. Es esencial en algunas funciones contráctiles y controla interacciones celulares, adhesión molecular y transporte intracelular.
β -Tubulina (<i>tub β</i>)	Principal componente del citoesqueleto. Los microtúbulos intervienen en diversos procesos celulares que involucran desplazamiento de vesículas de secreción, movimiento de orgánulos, transporte intracelular de sustancias, así como durante la división celular (mitosis y meiosis).
Proteína de unión a lipopolisacárido y β -1,3 glucano (<i>lgbp</i>) Cavortina (<i>cvt</i>)	Participa en la activación de la cascada profenoloxidasas que es una respuesta general de sistema inmune innato en invertebrados. Es una proteína no pigmentada, glicosilada con actividad de inhibición de serin-proteasas, que se asocia con hierro lo que indica que puede funcionar como agente quelante del hierro
Proteína de interferón 44	Proteína implicada en defensa antiviral, actividad antiproliferativa y posiblemente contribuye a la detención del ciclo celular ya que provoca una disminución de GTP celular y suprime la señalización de cinasas reguladas por una señal extracelular.
Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (<i>gapdh</i>)	La gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) cataliza la oxidación de un aldehído, el gliceraldehído-3-fosfato (reacción exergónica) y sintetiza un acil-fosfato, el 1,3-difosfoglicerato (1,3-bisfosfoglicerato) (reacción endergónica).
Factor de elongación 1 (<i>ef1-α</i>)	Proteína con múltiples subunidades que es responsable de la unión dependiente del GTP de los aminoacil-ARNt a los ribosomas eucarióticos. La subunidad (EF1- α) se une al aminoacil-ARNt y los transfiere al ribosoma en un proceso vinculado a la hidrólisis del GTP.
28s ribosomal	ARN ribosomal subunidad 28S.

3. JUSTIFICACIÓN

El impacto de los florecimientos de dinoflagelados tóxicos sobre los moluscos bivalvos en las costas de México es un hecho que se ha observado cada vez con mayor frecuencia (Cortés-Altamirano et al., 1998b). En la región Noroeste de México, particularmente la Costa Occidental de la península de B.C.S. y Golfo de Baja California, es común que estacionalmente se presenten eventos FANs (Lechuga-Devéze y Morquecho-Escamilla, 1998).

Los problemas ocasionados por efecto de las mareas rojas no son exclusivos de organismos marinos en su medio natural, sino también se han reportado casos en granjas de cultivo (como en granjas ostrícolas de las costas de California, Oregón y Washington, en E.U.A.), así como en las costas mexicanas de Sonora y Baja California, donde en los cultivos se alcanzaron mortandades de hasta el 90%. Problemas similares se presentaron en la granja ostrícola SOL AZUL, ubicada en el estero El Cardón (San Ignacio, B.C.S.) durante Febrero, Mayo y Octubre de 1998, donde ocurrieron mortandades considerables de los “stocks” de *C. gigas*; los organismos mayormente afectados fueron las larvas fijadoras (semillas).

En virtud de que las mortandades ocurrieron en zonas de cultivo, es imperativo estudiar el efecto de estas toxinas a nivel fisiológico y molecular, principalmente en juveniles de talla pequeña, debido a que en dicho estadio son más vulnerables ante cualquier tipo de estrés, además son más susceptibles a las toxinas que los juveniles de mayor talla y adultos,

debido a que no cuentan con un sistema enzimático efectivo para eliminar dichos compuestos y su tasa metabólica de crecimiento es más alta (Vasconcelos et al., 2010). Desde el punto de vista ecológico, esta talla corresponde a la principal cohorte responsable del reclutamiento poblacional, por lo que cualquier efecto negativo en su sobrevivencia afectaría directamente los tamaños poblacionales y por lo tanto, las cadenas tróficas a varios niveles.

A pesar de toda la información existente de los efectos de las toxinas PST en moluscos bivalvos, aún falta conocimiento del mecanismo de acción, de los procesos moleculares y rutas metabólicas involucradas en respuesta a estas toxinas, sobre inmunotoxicidad, citotoxicidad, genotoxicidad; además, de estudios que evalúen los efectos subcrónicos o crónicos. El monitoreo de genes específicos, involucrados en rutas metabólicas esenciales para mantener la homeostasis del ostión *C. gigas*, será importante para conocer el efecto que tiene la exposición a diferentes concentraciones de células de *G. catenatum* y el tiempo de exposición, y detectar que genes son los que están siendo más alterados o más susceptibles a la presencia de estos organismos FAN. Por lo tanto, estudios moleculares sobre la expresión diferencial serán útiles como modelo de interacción entre este dinoflagelado tóxico con poblaciones naturales de otros moluscos bivalvos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general.

Determinar el efecto de la exposición a *Gymnodinium catenatum*, productor de toxinas paralizantes sobre la expresión génica en juveniles de ostión del Pacífico *Crassostrea gigas*.

4.2 Objetivos particulares.

- Determinar el efecto de la exposición aguda y subcrónica a *Gymnodinium catenatum* en juveniles (3 ± 1 mm) de *Crassostrea gigas*, sobre la expresión de genes seleccionados mediante RT-PCR y RT-qPCR.
- Determinar el efecto de exposición subcrónica a *Gymnodinium catenatum* en juveniles (50 ± 10 mm) de *Crassostrea gigas*, sobre la tasa de expresión de genes seleccionados en glándula digestiva y hemocitos por RT-qPCR.
- Evaluar el daño histológico en juveniles (3 ± 1 mm) y (50 ± 10 mm) de *C. gigas* como respuesta al efecto de una exposición a *G. catenatum*.

5. HIPÓTESIS

Si la exposición de c gigas a *Gymnodinium catenatum* induce cambios en la expresión de genes relacionados al mantenimiento de la homeostasis celular entonces, estos cambios podrán ser identificados al monitorear la expresión de genes de respuesta al estrés, detoxificación, sistema inmune, inflamación, regulación de ácidos nucleicos y citoesqueleto.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Descripción de las microalgas utilizadas en los bioensayos.

Para llevar a cabo los experimentos se utilizaron dos cepas de dos microalgas, las cuales forman parte de la colección de Microalgas del CIBNOR (Laboratorio de alimento vivo y Cepario, Programa de Acuicultura, CIBNOR).

6.1.1 *Isochrysis galbana*

I. galbana es una microalga de color amarillo con dos flagelos móviles, sin pared celular. Mide entre 6 y 8 μm , crece a temperaturas entre 16 y 35°C, salinidades entre 25 y 28 ups e iluminación intermedia 150 $\mu\text{E m}^2\text{s}^{-1}$. Por su alto contenido de ácidos grasos

poliinsaturados, esta especie es es muy importante en la acuicultura como alimento para las larvas de moluscos bivalvos y de camarón (Fábregas et al., 1985). La cepa utilizada fue la ISG-1 y los cultivos fueron crecidos en bolsas de plástico con medio f/2, mantenidos a 20 ± 1 °C bajo iluminación constante y a $150 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad de luz.

6.1.2 *Gymnodinium catenatum*

G. catenatum (cepa GCCV-6) es un dinoflagelado desnudo, con formas unicelulares con dos flagelos disimilares: un flagelo que nace en una hendidura transversal (*sulcus*) y otro longitudinal que se aloja en una hendidura longitudinal (*cingulum*); el flagelo transversal es el que provee la mayor fuerza de empuje a la célula para el nado. Se presentan células de 34-65 μm de largo y 27-43 μm de ancho, es formador de cadenas, y la cepa fue aislada de Bahía Concepción, B.C.S., México (Band-Schmidt et al., 2005). Esta especie es capaz de producir toxinas paralizantes del tipo C (C1-4), neosaxitoxina (NEO), gonyautoxinas (GTX1-4), toxinas decarbamoil (dcSTX, dcGTX) (Band-Schmidt et al., 2005, 2010) y saxitoxina (STX) que es la forma más peligrosas por su toxicidad (80 $\mu\text{g}/100$ g de carne de molusco), hidrosolubilidad y termoestabilidad (FAO, 2005). La cepa GCCV-6 produce entre 25.7-101 pg/cel de STX_{eq} (Pérez-Linares et al., 2008, 2009) y ha sido responsable de severos episodios tóxicos PSP. Los florecimientos de *G. catenatum* se presentan generalmente en la primavera, pero algunos han ocurrido en el otoño-invierno, alcanzando densidades de 78 a 6.6×10^2 cel mL^{-1} (Cortés-Altamirano, 1998b). *G. catenatum* tiene una amplia distribución mundial, principalmente en zonas cálidas y

templadas (Green et al., 2004). En México se localiza desde el Golfo de California hasta las costas del estado de Oaxaca (Cortés-Altamirano et al., 1998b).

6.2 Cultivo y cosecha del dinoflagelado.

Para cultivar *G. catenatum* se utilizó el medio f/2 + Se (Guillard, 1975), preparado con agua de mar (35 ups) filtrada con membranas de 0.45 μm y esterilizada en autoclave (121°C, 15 lb, 20 min). Se realizaron cultivos estáticos de 1,000 mL en matraces Fernbach de 2.8; los cultivos se mantuvieron en el Cepario del CIBNOR en cámaras adaptadas con lámparas de luz blanca (irradiación de 150 $\mu\text{E m}^2\text{s}^{-1}$) y ciclos de luz y oscuridad 12:12 h, a una temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$.

Para monitorear la tasa de crecimiento (número de divisiones/día) y la densidad celular de los cultivos a utilizar en los bioensayos, se tomaron alícuotas de 1.5 mL por triplicado cada 48 horas (de todos los cultivos), desde el día cero (día de inoculación) hasta que los cultivos alcanzaron la fase de muerte (día 26). Enseguida se fijaron con una gota de lugol (I_2 , 5%/KI 10%), y se llevaron a cabo conteos celulares directos al microscopio utilizando una cámara Sedgwick Rafter. La fórmula para obtener el número de células mL^{-1} fue la siguiente:

$$\text{Número de células/mL} = \text{No. células totales} \times \text{factor de dilución} \times 10,000 \quad (1)$$

La tasa de crecimiento fue calculada utilizando la siguiente fórmula:

$$\mu = (\text{Log}_2 B_n - \text{Log}_2 B_0) / (t_n - t_0) \quad (2)$$

Para el reto experimental de exposición de los ostiones, el dinoflagelado se cosecho al final de la fase de crecimiento exponencial (18 días de cultivo). Se prepararon tres mezclas de *I. galbana* y *G. catenatum*, que se utilizaron como dietas para los ostiones, por lo tanto, para alcanzar la densidad celular deseada, los cultivos fueron diluidos o concentrados (según lo requerido). Para el tratamiento con la mayor densidad celular ($30 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$) varios lotes de cultivo de *G. catenatum* se homogenizaron, se midió el volumen total, se tomaron alícuotas (por triplicado) para el conteo y las células se cosecharon mediante centrifugación a $2500 \times g$ 10 minutos a 20°C . El sobrenadante se desechó y la biomasa sedimentada se resuspendió en un nuevo volumen de medio de cultivo para alcanzar la densidad celular requerida para el tratamiento.

6.3 Bioensayos con juveniles de *C. gigas* ($3 \pm 1 \text{ mm}$).

6.3.1 Diseño experimental

Se utilizaron *C. gigas* diploides, de talla entre $3 \pm 1 \text{ mm}$, provistos por el laboratorio de producción “Acuacultura Robles SPR de RI”. Los organismos se aclimataron en el Laboratorio Húmedo de Seguridad Biológica (LHSB, CIBNOR) por un periodo de dos semanas, en recipientes plásticos de 10 L con agua de mar filtrada ($0.45 \mu\text{m}$), con flujo de

oxígeno, a 21°C y salinidad controlada (34 ups). La dieta consistió de 0.75×10^6 cel mL⁻¹ de *Isochrysis galbana* libre de bacterias, obtenida del Laboratorio de Alimento Vivo del CIBNOR.

Para determinar la respuesta (en términos de expresión génica) de *C. gigas* ante su exposición a *G. catenatum* tóxico, se llevó a cabo un bioensayo de exposición aguda (24 h) probando tres diferentes concentraciones del dinoflagelado (Tabla I).

Los organismos (25) fueron colocados en frascos de vidrio de 100 mL, utilizando ½ de su capacidad (50 mL). Bajo estas condiciones, los organismos se aclimataron durante cuatro días con una dieta a base de *I. galbana* (0.75×10^6 cel mL⁻¹) hasta la realización del experimento. Los frascos contaron con sistema de aireación constante y se mantuvieron a una temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ (clima artificial automatizado). Los ostiones fueron expuestos a diferentes concentraciones celulares de microalgas (mezclas, tabla I) para tener una exposición directa al dinoflagelado tóxico; se prepararon tres tratamientos y dos controles. Las mezclas de microalgas se prepararon con una proporción 1:1 del volumen de cada una en un volumen final de 50 mL; cada tratamiento se evaluó por triplicado y se proporcionó en una sola dosis diaria.

Tabla II. Diseño experimental del bioensayo de exposición de *C. gigas* (3 ± 1 mm) a *G. catenatum*.

Tratamientos	N	Microalgas (cel mL ⁻¹)	
		<i>I. galbana</i>	<i>G. catenatum</i>
Control negativo a toxinas PSP	3n	0.75×10^5	Cero
Control positivo a toxinas PSP	3n	Zero	3×10^3
T1	3n	0.75×10^5	0.3×10^3
T2	3n	0.75×10^5	3×10^3
T3	3n	0.75×10^5	30×10^3

Notas: (3) es el número de repeticiones, (n) es el número de ostiones juveniles por unidad experimental (25).

Se realizaron observaciones de supervivencia y comportamiento alimenticio al determinar la tasa de aclaramiento bajo cada condición experimental. Para ello se tomaron muestras de agua de cada una de las unidades experimentales al finalizar el experimento, determinándose el número residual de células. Posteriormente, para determinar la disminución en la concentración de las microalgas en los bioensayos debido a la filtración de los ostiones en determinado intervalo de tiempo, se calculó la tasa de aclaramiento (TA) mL h⁻¹ mediante la siguiente ecuación (Coughlan, 1969):

$$TA = \text{Ln} (N_0/N_t) * M/t \quad (3)$$

dónde:

N_0 es la concentración inicial de la microalga en el medio de crecimiento

N_t es la concentración después de 24 horas

M es el volumen total que se utilizó en cada unidad experimental, y

t es el tiempo después de iniciar el experimento (24 h).

Para determinar los cambios en la expresión génica, se realizaron siete muestreos: uno en la hora cero y cuatro correspondientes a las 3, 6, 12 y 24 h de exposición al dinoflagelado (respuesta aguda), así como a los 3, 7 y 14 días (respuesta subcrónica). En cada tiempo de muestreo se colectaron cinco ostiones por réplica. Los organismos muestreados de cada unidad experimental (correspondientes a cada tiempo de muestreo), fueron reemplazados por ostiones expuestos a las mismas condiciones experimentales (unidades experimentales solo para reemplazo) de forma que el número de organismos en cada unidad experimental se mantuvo constante durante los bioensayos. Las muestras fueron colocadas en tubos Eppendorf, fueron lavadas con agua de mar estéril y finalmente congeladas a -80°C hasta su posterior análisis.

6.4 Bioensayos con juveniles de *C. gigas* (50 ± 10 mm)

6.4.1 Diseño experimental

Se utilizaron *C. gigas* diploides, de talla entre 50 ± 10 mm, provistos por el laboratorio de producción “Acuicultura Robles SPR de RI”. Los organismos se aclimataron en el Laboratorio Húmedo de Seguridad Biológica (LHSB, CIBNOR) por un periodo de dos semanas, en recipientes plásticos de 10 L con agua de mar filtrada ($0.45 \mu\text{m}$), con flujo de oxígeno, a 21°C y salinidad controlada (34 ups). La dieta consistió de 0.75×10^6 cel mL^{-1} de *I. galbana* libre de bacterias, obtenida del Laboratorio de Alimento Vivo del CIBNOR.

El bioensayo de exposición a *G. catenatum* se realizó en recipientes de 4 L en los que se colocaron dos cedazos de PVC cerrados por un extremo con tela de plástico, que sirvieron como soporte para colocar 10 organismos (en cada uno); en total se colocaron 20 organismos en cada unidad experimental. El bioensayo consistió en un solo tratamiento y dos controles (por triplicado); los ostiones se alimentaron con una mezcla de *I. galbana* (2×10^6 cel mL⁻¹) y *G. catenatum* (6×10^3 cel mL⁻¹), usándose como control no tóxico una dieta de *I. galbana* (6×10^3 cel mL⁻¹) y como control tóxico una dieta con sólo *G. catenatum* (6×10^3 cel mL⁻¹). Se realizaron cuatro muestreos: uno en la hora 0 y tres correspondientes a los 1, 3 y 7 días de exposición al dinoflagelado. En cada tiempo de muestreo se colectaron cuatro organismos por réplica; los organismos muestreados de cada unidad experimental se remplazaron por otros (previamente marcados), de forma que el número de organismos en cada unidad experimental se mantuvo constante.

Las muestras fueron procesadas de la siguiente manera: primero se extrajo hemolinfa directamente del pericardio (jeringa de 3 mL) haciendo un pool de hemolinfa por cada réplica y colocándola inmediatamente en hielo. Después las muestras se centrifugaron a 800xg por 5 min, en una centrífuga refrigerada a 4°C y tanto el botón de células como el sobrenadante (plasma) fueron inmediatamente etiquetados y almacenados por separado a -70°C hasta su posterior análisis. Adicionalmente, se tomaron muestras de cuatro tejidos por separado (branquia, gónada, glándula digestiva y músculo), haciendo un pool de tejidos por cada réplica (4 organismos). De estas muestras homogéneas se tomaron 30 mg para llevar a cabo la extracción de RNA y análisis de expresión tejido-específico (solo para glándula digestiva); el resto de los tejidos se almacenaron a -80°C.

Adicionalmente, se evaluó la tasa de aclaramiento (sección 6.3.1), al final solo cambian las unidades, ya que para este bioensayo se reporta TA en $L h^{-1}$.

6.5 Extracción de ARN total y síntesis de ADN complementario (ADNc)

Para la extracción del ARN total de las muestras se probaron diferentes kits de extracción: 1) SV Total RNA Isolation System (Promega©,USA), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante (Technical Manual #TM048, www.promega.com); 2) Trizol® (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante y, por último, 3) solución AGPC (tiocianato de guanidina acetato de sodio-fenol-cloroformo) o TRI Reagent (Chomczynski y Sacchi, 1987), con reactivos preparados en el laboratorio. Para determinar la cantidad y calidad del ARN extraído, las muestras se leyeron en un espectrofotómetro-UV Nanodrop 2000® (Thermo Scientific) utilizando el coeficiente de la relación de las lecturas de la absorbancia a 260 y 280 nm, considerando como ARN de buena calidad aquellas muestras con un coeficiente de entre 1.8 a 2.1, lo que significa que el ARN no está contaminado; el factor de conversión utilizado fue de $40 \mu g mL^{-1}$.

La integridad y pureza del ARN extraído se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% con TBE 1X preparado con agua DEPC. La ausencia de ADN genómico en las muestras de ARN se verificó mediante PCR directo utilizando los oligonucleótidos universales para el gen 28S ribosomal cg28SF, 5'-GCAGGAAAAGAACTAAC-3'; cg28SR, 5'-CCTCTAAGTGGTTTCAC-3'. Para las reacciones de PCR se utilizó como

templado 1 μL de cada muestra de ARN sin diluir (500-1500 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$), y como control positivo una muestra de ADN complementario de *C. gigas*; el control negativo contenía la mezcla de reacción sin templado.

Una vez verificada la ausencia de contaminación por ADN, se realizó la síntesis de ADNc con el kit First-Strand cDNA Synthesis Reaction (Invitrogen®), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la síntesis se utilizaron 5 μL de ARN a una concentración de 100 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ (total 0.5 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$), 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de oligo dT y 0.2 μL (200 U) de transcriptasa reversa.

6.6 Diseño de oligonucleótidos para RT-PCR.

Se seleccionaron secuencias específicas de *C. gigas* reportadas en el banco de genes (NCBI) para 25 genes implicados en diferentes rutas metabólicas. Para cada gen se diseñó un par de oligonucleótidos utilizando el software DNAMAN®, y se enviaron sintetizar a Sigma-Aldrich Corporation, México. La relación de oligonucleótidos usados en los análisis RT-PCR se muestra en la tabla III.

Tabla III. Relación de genes, números de acceso a GenBank de secuencias de cDNA de *C. gigas* utilizados para el diseño de oligonucleótidos para RT-PCR.

Gene	No. acceso	Nombre	Tamaño (pb)	Metabolismo
Glutamina sintetasa	AJ558239	cgGS	402	
Glutación-S-transferasa	CB617406	cgGST	272	
Proteína de estrés térmico 70	AJ305325	cgHSP70	480	
Proteína de estrés térmico 90	EF687776	cgHSP90	491	Proteínas de estrés
Superóxido dismutasa CuZn	AJ496219	cgCuSOD	542	
Peroxidasa melanogénica	CB617557	cgPOXM	450	
ATP-sintetasa subunidad beta	CF369132	cgATPSb	416	
Subunidad P2X4, canal iónico	CB617507	cgP2X4	400	Cadena Respiratoria
Citocromo oxidasa I	AB033687	cgCOI	483	
Proteína p21	CB617437	cgP21	640	
Sub. 1 del ass-factor de p55 cromatina	CB617555	cgCHRAFp 55	500	Regulación de ciclo celular
Factor de elongación 2	CB617558	cgFE2	455	
Inmunolectina B	CB617455	cgIMMLB	542	
LPS y β -1,3 glucano	CB617438	cgLPSBP	455	Respuesta inmune
Lectina hepática	CB617560	cgLH	620	
β -timosina	CB617380	cgTHYM	455	
Actina (GIA)	AF026063	cgACTN	582	
Actina citoplasmática A3	CF369133	cgACTCA	364	Citoesqueleto
Tubulina β	CB617442	cgTUB	393	
Lisozima	CB617495	cgLIZ	415	
Tripsina	CB617494	cgTRIP	278	Regulación proteica
Inhibidor de proteasas S/C	CB617554	cgINSERP	432	
Fosfatasa alcalina	CB617556	cgALKP	351	Mantenimiento energético
Glucanasa β -1,3	CB617548	cgGLNS	390	
Subunidad ribosomal 28S	AY632555	cg28S	300	CONTROL

6.7 Estandarización de las curvas de saturación y análisis de expresión mediante RT-PCR.

Se realizaron reacciones de PCR con los diferentes juegos de oligonucleótidos para establecer el mejor ciclo de amplificación para todas las muestras sin llegar al punto de saturación. Se probaron diferentes ciclos en el programa de amplificación (20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50), en este trabajo se muestran solo 3 ejemplos: *tubulina β* , *28S ARNr* y *superóxido dismutasa Cu/Zn*. Para realizar dichas curvas, se tomó 1 μ L de cada una de las muestras de ADNc para hacer una mezcla; y a partir de esta se tomó 1 μ l (300 ng) el cual sirvió como ADN molde para las reacciones de PCR.

Para la amplificación de las regiones específicas de los genes blancos, en un tubo Eppendorf de 200 μ L se colocaron 1 μ L de ADNc (300 ng), 1 μ L del oligonucleótido F y 1 μ L del oligonucleótido R (10 picomoles de cada primer). Aparte, se preparó la mezcla de reacción: por cada reacción se adicionaron 5 μ L del buffer 10X PCR (Tris-HCl 100 mM pH 8.3, KCl 500 mM, MgCl₂ 25 mM, 0.01% gelatina), 1 μ L de dNTPs 10 mM, 0.2 μ L de Taq polimerasa (5 U/ μ L) y 39.3 μ L de agua destilada estéril. La mezcla se homogenizó con micropipeta y se agregaron 47 μ L de esta mezcla a cada tubo que contenía el ADNc y los oligonucleótidos, para completar un volumen final de 50 μ L. Finalmente, a los tubos se les dio un pulso en la centrífuga y se colocaron en el termociclador (Corbette Palm Cycler) utilizando las siguientes condiciones de amplificación: desnaturalización inicial a 95°C por 5 min (1 ciclo); desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 45°C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min (35 ó 40 ciclos); extensión final a 72°C por 10 min (1 ciclo).

Los productos de PCR (amplicones) se analizaron en geles de agarosa/Synergel® al 1% en buffer TBE 1X. Se cargaron 10µL de cada amplicon más 1µL del colorante azul de bromofenol (previamente mezclados); la electroforesis se desarrolló en cámaras horizontales (Mini Sub Cell, Biorad) a 80 V durante 1 h. Los geles se documentaron digitalmente en un sistema UVITEC (UVP Inc®) bajo las siguientes condiciones: foco 2, aumento 25X y brillo 0.400. La medición de los niveles de expresión se realizó usando el software UVIDOC V. 97, con el que mediante análisis densitométrico (intensidad de la banda en pixeles) se obtuvieron los datos cuantitativos, reportados como unidades de intensidad relativa para cada uno de los genes analizados.

6.8 Diseño de oligonucleótidos para qPCR.

Para realizar los análisis de qPCR, se diseñaron nuevos oligonucleótidos (Tabla IV) utilizándose las secuencias de *C. gigas* previamente seleccionadas y reportadas en la Tabla III. Para calcular la T_m (temperatura de hibridación), contenido GC y tamaño del fragmento se utilizaron los softwares primer3 (<http://primer3.ut.ee>) y DNAMAN®. Posteriormente, para corroborar la ausencia de formación de estructuras secundarias, se utilizó el software RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>). Finalmente, para verificar la especificidad a *C. gigas* se realizó el alineamiento de los fragmentos esperados mediante un análisis de homología con las secuencias depositadas en el Gen Bank utilizando el BLASTnt (Basic Local Alignment and Search Tool, NCBI), disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

Tabla IV. Relación y características generales de oligonucleótidos diseñados para análisis de RT-qPCR (* genes candidatos).

Nombre	Secuencia 5'-3'	Gene	Amplicon (pb)	No. acceso GenBank	Tipo de gen
Cg- 28s-Fw*	GGAGTCGGGTTGTTTGAGAATGC	<i>Subunidad ribosomal</i>	114	AY632555	Proteína ribosomal
Cg- 28s-Rv*	GTTCTTTTCAACTTTCCCTCACGG	28S			
Cg- <i>gapdh</i> -Fw*	GTTCAAATATGATTCAACTCACGG	<i>Gliceraldehído3-fosfato deshidrogenasa</i>	109	AJ544886	Metabolismo
Cg- <i>gapdh</i> -Rv*	TGGATCCCGTTCGCAATATACG				
Cg- <i>tub β</i> -Fw*	AGCAGATGTCGTAGAGAGCTTC	<i>Tubulina β</i>	144	CB617442	Citoesqueleto
Cg- <i>tub β</i> -Rv*	TGAACACATTCTCCGTTGTCCC				
Cg- <i>act</i> -Fw*	TACTCTTTCACCACCACAGCCG	<i>Actina</i>	117	AF026063	
Cg- <i>act</i> -Rv*	TAGAGATGAGGATGAAGCAGCAG				
Cg- <i>ef-1α</i> -Fw*	ACCATACAGTGAGGCTCGATTC	<i>Factor de elongación 1-α</i>	138	AB122066	Factor de transcripción
Cg- <i>ef-1α</i> -Rv*	GTGGAAGCCTCAATCATGTTATC				
Cg- <i>p21</i> -Fw	TTCCCATTCTCCCATGTTGTTC	<i>Proteína p21 reguladora del ciclo celular</i>	100	CB617437	Proteínas de regulación del ciclo celular
Cg- <i>p21</i> -Rv	ACAGGCGACATGGATTTAGAAGC				
Cg- <i>cafp55</i> -Fw	TCGAAGATCCCACAAAGCAACAG	<i>Factor 1 de ensamblaje de cromatina sub. p55</i>	77	CB617555	
Cg- <i>cafp55</i> -Rv	TGTCCTTCAACCCCTACAGCGA				
Cg- <i>ef2</i> -Fw	TTGATCACGGCAAGTCTACTCTG	<i>Factor de elongación 2</i>	109	CB617558	
Cg- <i>ef2</i> -Rv	GAGATGGCAGTGGACTTGATGG				
Cg- <i>p53</i> -Fw	CTGTAGTTCTGGCCCGTGAA	<i>Proteína p53</i>	110	AM236465	Apoptosis
Cg- <i>p53</i> -Rv	AAACACAAGGGCACCAACAAG				
Cg- <i>cp1</i> -Fw	ACTACAGAAAGCCGCCGAAT	<i>Caspasa 1</i>	87	HQ425703	Inflamación
Cg- <i>cp1</i> -Rv	GATCATTCTGTGCTACCCCC				
Cg- <i>gst-s</i> -Fw	GACCCAGATGACCCTTACCG	<i>Glutación S-transferasa</i>	71	CB617406	Detoxificación celular
Cg- <i>gst-s</i> -Rv	CCGAAACAACTGAGAGAAGACC				
Cg- <i>cpy450</i> -Fw	ACAGGGACTTCATTGACAGCATG	<i>Citocromo p450</i>	151	EF645271	
Cg- <i>cpy450</i> -Rv	ATTGTGAAACGAGTACTGTCTACC				
Cg- <i>sod-cu/zn</i> -Fw	GACAAAATGATTGACTTGGCCGG	<i>Superóxido dismutasa cu/zn</i>	144	AJ496219	Defensa antioxidante
Cg- <i>sod-cu/zn</i> -Rv	CACTCCACAAGCCAATCGTCCG				
Cg- <i>coi</i> -Fw	GTGTATGTCCTTATTCTTCCAGG	<i>Citocromo C oxidasa I</i>	182	AB033687	Cadena respiratoria
Cg- <i>coi</i> -Rv	GCACGCGTATCAATATCCATTCC				

<i>Cg-tryp</i> -Fw	GCCAGTGACGTAAGACAACCTCG	<i>Tripsina</i>	125	CB617494	Regulación proteica
<i>Cg-tryp</i> -Rv	CAACCATCAACAACGACATTGCC				
<i>Cg-lgbp</i> -Fw	TTGTCCAGTTCTCCCAGCTTCC	<i>Proteína de unión a</i>	108	CB617438	
<i>Cg-lgbp</i> -Rv	GACTACTGGAATGGGATGAAGAAC	<i>LPS y β-1,3 glucano</i>			
<i>Cg-cvt</i> -Fw	ATCTCCATCTCCATGACGACG	<i>Cavortina</i>	144	AY256853	Sistema immune
<i>Cg-cvt</i> -Rv	CGATGACAGCGGTATGAGAGG				
<i>Cg-if44</i> -Fw	CATACTGGACGGCAACATACC	<i>Proteína inducida por</i>	109	FJ440108	
<i>Cg-if44</i> -Rv	ATGAATCCTGTCCCCGAGAT	<i>interferón 44</i>			

6.9 Estandarización de las condiciones para RT-qPCR.

El análisis de la eficiencia es crucial en la cuantificación de la expresión de genes mediante qPCR, dado que esta aproximación está fuertemente influenciada por los componentes de la reacción (Pfaffl, 2004). Las diferencias en la eficiencia de amplificación entre los genes blanco y los de referencia pueden tener un gran impacto en la productividad de la PCR y llevar a errores en cuantificación relativa.

La eficiencia (E) de la PCR en tiempo real se define como la capacidad de la reacción de duplicar el número de copias de las cadenas de ADN o ADNc en cada ciclo (Bustin, 2002; Pfaffl, 2004). La eficiencia de la PCR en tiempo real se calcula a partir de las pendientes de las curvas estándar obtenidas después de realizar diluciones seriadas con las reacciones de la PCR de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$E=10[-1/\text{pendiente}]-1 \quad (4)$$

En esta tesis se determinó la eficiencia de la qPCR para cada uno de los oligonucleótidos de los diferentes genes evaluados: genes de referencia ó controles internos y genes blancos o de interés. A partir de cuatro diluciones seriadas (Tabla V), se construyó una curva estándar para cada uno de los genes de referencia así como para los genes blancos. La amplificación se realizó por triplicado para cada una de las diluciones, utilizando el ADN complementario (mezcla de ADNc de las muestras control y de los tratamientos) de las muestras de los bioensayos con juveniles de *C. gigas* de las dos tallas.

Tabla V. Concentraciones de ADNc probadas para las curvas estándar.

Dilución	Factor de dilución	Concentración (ng μl^{-1})		Templado (μL)
		Inicial	Final	
1:5	0.04	80	16	5
1:5	0.008	16	3.2	5
1:5	0.0016	3.2	0.64	5
1:5	0.00032	0.64	0.128	5

6.10 Determinación de la estabilidad de los genes de referencia candidatos para juveniles de talla pequeña (3 ± 1 mm).

Algunos de los genes de referencia más utilizados incluyen: β -actina, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hipoxantina guanina fosforibosil-transferasa y 18S del ARN ribosomal. La elección correcta de los genes de referencia para la normalización de la qPCR es esencial. Se ha demostrado que el uso de un solo gen como gen de referencia es susceptible a tener errores en la interpretación de los resultados. En consecuencia, para normalizar el nivel de expresión de los genes es necesario utilizar más de un gen de referencia (Huggett et al., 2005). Por lo tanto, en este trabajo se analizó la estabilidad del nivel de expresión de cinco genes candidatos a utilizarse como genes de referencia (tabla IV). Una vez que fueron determinadas las curvas estándar, dichos genes se corrieron con las muestras del bioensayo con ostiones de talla pequeña expuestos al dinoflagelado durante una exposición aguda (3, 6, 12 y 24 h) y exposición subcrónica (muestras de los día 7 y 14); así como para los ostiones de mayor talla (50 ± 1 mm) con muestras de los días 1, 3 y 7, utilizando los siguientes componentes por reacción: 1.5 μL de Buffer 10X, 0.75 μl de MgCl_2 (50 mM), 0.5 μL de dNTPS (2mM), 0.75 μL de Eva Green (20X) (Biotium, CA), 0.3 U de Taq polimerasa platinum, 1.4 μL de oligonucleótidos (forward y reverse), 5 μL de

ADNc ($0.64 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ para los ostiones de $3 \pm 1 \text{ mm}$, y $3.2 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ para los ostiones de $(50 \pm 10 \text{ mm})$ y $5.8 \mu\text{L}$ de agua miliQ en un volumen final de $15 \mu\text{L}$, como control negativo se utilizó agua miliQ.

Para realizar los análisis de estabilidad de los genes de referencia candidatos, los valores de CT o Cq (número de ciclo en el que la curva de fluorescencia atraviesa el umbral de detección establecido) obtenidos para cada uno de los genes, fueron analizados con los programas: NormFinder (Andersen et al., 2004) GeNorm (Vandesompele et al., 2002) y BestKeeper (Pfaffl, 2004) utilizando RefFinder (<http://www.leonxie.com/referencegene.php?type=reference#>). Además, se realizó otro análisis utilizando un macro de excel del programa GeNorm; para este análisis los valores obtenidos de Cq fueron transformadas en cantidades relativas (Q) con un nivel de expresión máximo de 1 mediante la siguiente ecuación:

$$Q = E^{\Delta Cq} \quad (5)$$

$$Q = E^{(\min Cq - \text{sample } Cq)} \quad (6)$$

dónde:

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

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

$\min Cq$: menor valor de Cq = Valor de Cq de las muestras con menor expresión

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

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

BestKeeper, es un programa que se basa en un análisis de correlación pareada de los genes candidatos (Pfaffl, 2004). BestKeeper estima la correlación del nivel de expresión entre todos los posibles candidatos. Los genes altamente correlacionados son combinados en un

índice. Después de calcularse la correlación pareada entre cada candidato y el índice, se explica la relación entre el índice y la contribución del gen candidato.

Una vez optimizadas las condiciones para el PCR tiempo real (mezclas de reactivos, la concentración de los primers, concentración del marcador fluorescente y la concentración de la muestra), así como los genes de referencia que se van a utilizar, se continuó con la cuantificación de la expresión de los genes blanco.

6.11 Análisis cuantitativo de expresión génica

Para llevar a cabo todas las reacciones de qPCR, se utilizaron los siguientes componentes por reacción: 1.5 μL de Buffer 10x, 0.75 μL de MgCl_2 (50 mM), 0.5 μL de dNTPS (2mM), 0.75 μL de Eva Green (20X) (Biotium, CA), 0.3 U de Taq polimerasa platinum, 1.4 μl de oligonucleótidos (forward y reverse), 5 μl de ADNc y 5.8 μL de agua miliQ en un volumen final de 15 μL , como control negativo se utilizó agua miliQ. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 10 min a 95°C; seguidos de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 s, de elongación a 65°C por 1 min y de polimerización a 75°C por 5 s. Por último se realizó una curva de disociación de 65°C a 95°C con un incremento de temperatura de 1°C cada 10 s. A partir de las curvas de disociación se revisó que la amplificación de los genes mostrara un producto único y específico visualizado como un solo pico.

6.12 Determinación de la estabilidad de los genes de referencia candidatos tejido-específico (glándula digestiva y hemocitos) en juveniles (50 ± 10 mm) de *C. gigas*.

Se realizaron las reacciones de qPCR por triplicado, para las muestras de glándula digestiva y hemocitos (la estandarización de las curvas de calibración se describe detalladamente en el apartado 4.8.1). Los análisis de estabilidad de los genes de referencia se realizaron como se describe en el apartado 4.8.2. Además, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía como análisis complementario a los programas utilizados. Una vez que se determinó el gen de referencia a utilizar, se realizaron los análisis cuantitativos de transcritos de los genes de la glándula digestiva involucrados en:

Regulación del ciclo celular:

Proteína p21 (*p21*)

Factor 1 de ensamblaje de cromatina sub. p55 (*cafp55*)

Factor de elongación 2 (*ef2*)

Inflamación y apoptosis,

Caspasa 1 (*casp 1*)

Proteína p53 (*p53*)

Citoesqueleto,

Actina (*act*)

Tubulina β (*tub β*)

En hemocitos, los genes involucrados en:

Respuesta inmune y estrés,

Cavortina (*cvt*)

Proteína inducida por interferón 44 (*if44*)

Proteína de unión a LPS y β -1,3 glucano (*lgbp*)

HSP70 (*hsp70*)

6.13 Análisis histológico en juveniles de *C. gigas* (3 ± 1 mm) y (50 ± 10 mm)

Para la determinación de las alteraciones morfológicas, se tomó un organismo por tratamiento/réplica al final del periodo de exposición (14 días) para los juveniles de talla pequeña (3 ± 1 mm) y se fijaron en solución Davidson (Shaw y Battle, 1957 citado en Howard y Smith, 1983) por 48 h, después se conservaron en etanol al 70% hasta su posterior análisis. Además, se tomaron muestras de juveniles de mayor talla (50 ± 10 mm) al día 7, se les retiró la concha y los organismos completos fueron envueltos en tela de gasa e inmediatamente se fijaron en solución Davidson (Shaw y Battle, 1957 citado en Howard y Smith, 1983) por 48 h, después se conservaron en etanol al 70% hasta su posterior análisis. Los ostiones de talla pequeña, antes de realizar los cortes histológicos, se descalcificaron con una solución de citrato de sodio y ácido fórmico (Elston, 1999).

Para llevar a cabo las observaciones histológicas las muestras fueron deshidratadas en una serie progresiva de etanol al 70, 80, 95 y 100 %, aclaradas en xileno y posteriormente incluidas en parafina (Paraplas X-Tra). Se realizaron 6 cortes transversales de los organismos completos para observar el daño provocado por la exposición al dinoflagelado tóxico de cada replica por tratamiento; los cortes fueron preparados en secciones de 5 μ m de grosor, utilizando un micrótopo rotatorio (Leica RM 2155, Leica Microsystems). Finalmente, los cortes fueron montados en portaobjetos de vidrio y teñidos por 5 min con hematoxilina de Harry y 12 min con eosina (Martoja y Martoja-Pierson,

1967). Las láminas fueron examinadas bajo un microscopio de luz (Olympus BX41) para observar las lesiones en los tejidos.

6.14 Análisis estadísticos

Se calcularon los promedios y desviación estándar de los datos de las concentraciones de *G. catenatum*, y fueron transformados a logaritmo base 2 para obtener la tasa de crecimiento (número de divisiones día⁻¹) y el tiempo de duplicación, con base en la fórmula:

$$m = (\text{Log}_2 B_n - \text{Log}_2 B_o) / (t_n - t_o) \quad (7)$$

El efecto de *G. catenatum* en las tasas de aclaramiento de *C. gigas* se evaluó utilizando la prueba t-student para muestras independientes, con un nivel de significancia $p < 0.05$, entre las tasas de aclaramiento de los ostiones expuestos y los controles.

La estrategia de cuantificación utilizada para el análisis de la expresión génica por RT-qPCR fue la de cuantificación relativa. Los cálculos en cuantificación relativa se basan en la comparación de los valores Ct utilizando la eficiencia de la reacción de la PCR como factor de corrección. Sin embargo, hay un modelo que no requiere la eficiencia de la reacción para acceder a un factor de corrección, dicho modelo supone una eficiencia óptima e idéntica (correspondiente al 100%) en la eficiencia de reacción en la PCR tanto del gen en estudio como del gen de referencia (Livak y Schmittgen, 2001). En este trabajo se utilizó el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$, debido a que en este método no se requiere la eficiencia de reacción

como factor de corrección, y expresa la proporción obtenida de la relación entre los valores Ct de la muestra y los valores Ct del control (Pfaffl, 2001), mediante las siguientes ecuaciones:

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-[\Delta\text{Ct muestra} - \Delta\text{Ct control}]} \quad (8)$$

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} \quad (9)$$

Con este método no es necesario realizar curvas estándar en cada corrida, cada muestra es ajustada a la cantidad de templado que se utilizó, por comparación relativa con los genes de referencia. Estos valores son entonces normalizados relativamente a un tratamiento calibrador, este puede ser el control (no tratado), muestras, tiempo o tejido; en el presente estudio se utilizó como calibrador las muestras de ostiones alimentados con *I. galbana* (control negativo a toxinas). Se realizaron ANOVAs de dos vías para cada gen, tratamiento y tiempo de exposición, después de probar los supuestos de distribución de normalidad de los datos (prueba de Kolmogorov smirnov) y homogeneidad de varianzas (prueba de Levene); se hicieron pruebas *a posteriori* para encontrar las diferencias significativas, utilizando la prueba de comparación múltiple de Fisher (LDS). En todos los casos se usó una significancia estadística de $p < 0.05$ Statistic 8.0 (StatSoft, Tulsa, OK).

7. RESULTADOS

7.1 Curva de crecimiento de *G. catenatum*

En la figura 1a se muestra la curva de crecimiento obtenida para *G. catenatum* en medio f/2. La máxima concentración celular se registró entre los días 17 y 19 de cultivo; después del día 21 de incubación el cultivo entró en fase de muerte acelerada por lo que el conteo celular disminuyó considerablemente. La tasa de crecimiento (μ , número de divisiones celulares día⁻¹) más alta se registró a las 48 h de incubación (día 2) y disminuyó lentamente al avanzar la edad del cultivo (fig. 1b). De acuerdo a la gráfica, en el día 19 termina la fase exponencial e inicia la fase de muerte celular, prácticamente no existe una fase estacionaria como tal. Estos parámetros fueron importantes para determinar el tiempo de cosecha de las microalgas (estado fisiológico óptimo/mayor rendimiento de biomasa), para preparar las mezclas con el número de células apropiado para los bioensayos.

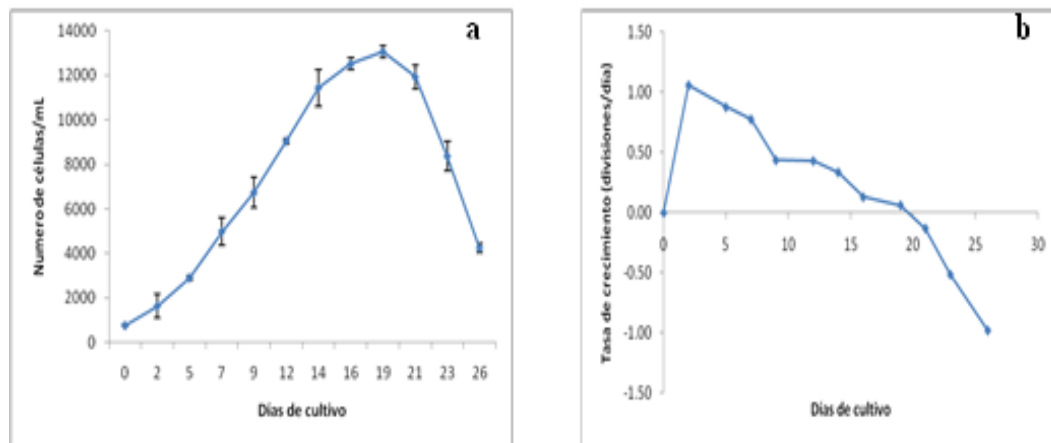


Figura 1. Parámetros de crecimiento de *G. catenatum* (en medio f/2 + Se, a 22 °C 35 ups y 150 $\mu\text{Em}^2\text{s}^{-1}$). Panel **a**, curva de crecimiento; panel **b**, tasa de crecimiento (divisiones/día).

7.2 Observaciones generales del bioensayo con ostiones juveniles

7.2.1 *C. gigas* de 3 ± 1 mm

En los organismos alimentados con *I. galbana*, el comportamiento fue normal (Fig. 2a) no se observó respuesta fisiológica adversa como: cese de la alimentación, retracción de manto, producción de pseudoheces; por el contrario, la eficiente remoción de la microalga de las unidades experimentales y formación de heces, fueron características del buen estado de salud de los organismos hasta el final del experimento. Alrededor de 8h después de haberles proporcionado el alimento, ya habían removido casi el 100 % de las células (fig. 2a). No se presentó mortalidad en ninguna de las réplicas de los tratamientos y el control.

El ostión del Pacífico expuesto a células de *G. catenatum* mostró cambios en su comportamiento alimenticio después de su exposición al dinoflagelado tóxico. Estos cambios consistieron en el cierre parcial y/o total de valvas, producción de pseudoheces (partículas de alimento no digerido envuelto en mucus) y moco, retracción del manto (no se observaron los cilios que lo rodean) (fig. 2b, c y d), así como una disminución de la capacidad de filtración, reportada como disminución en la tasa de aclaramiento (fig. 3).

Estos cambios se observaron después de 3 h de exposición a las células tóxicas en los ostiones alimentados con las dietas mixtas de *I. galbana* + *G. catenatum* 3×10^3 cel mL⁻¹ y 30×10^3 cel mL⁻¹. En los ostiones alimentados con el control tóxico (fig. 2b) y la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* 3×10^3 cel mL⁻¹ (fig. 2c) los organismos iniciaron la producción de pseudoheces en cantidades mínimas, este comportamiento continuó hasta las

12 h de exposición. Sin embargo, en los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* 30×10^3 cel mL⁻¹ los organismos permanecieron cerrados por más tiempo (> 3 h), algunos se mantuvieron cerrados hasta las 6 h de exposición y a partir de entonces iniciaron la producción de pseudoheces, que fue mayor (fig. 2d), continuando aún después de 12 h de exposición.

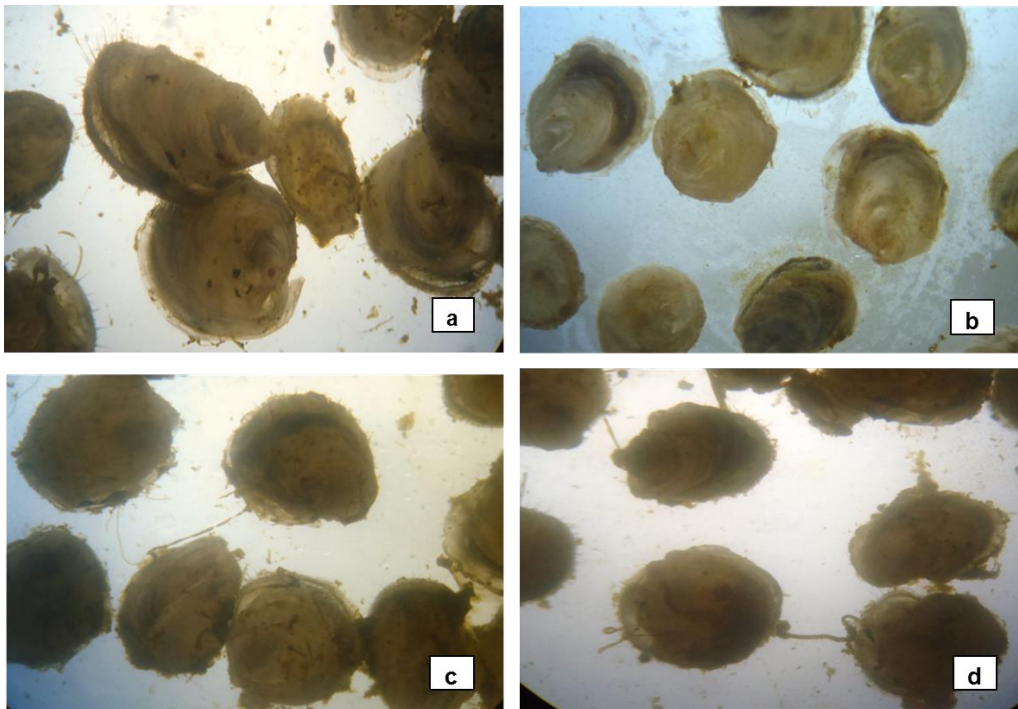


Figura 2. Juveniles de *C. gigas* de 3 ± 1 mm alimentados con *I. galbana* control negativo a toxinas PST (0.75×10^5 cel mL⁻¹) (a), con *G. catenatum* control positivo a toxinas PST (3×10^3 cel mL⁻¹) (b), con dieta mixta *I. galbana* + *G. catenatum* 3×10^3 cel mL⁻¹ (c), con dieta mixta *I. galbana* + *G. catenatum* 30×10^3 cel mL⁻¹ (d).

7.2.2 *C. gigas* de 50 ± 10 mm

En el bioensayo de exposición de organismos de 50 ± 10 mm de talla a la microalga tóxica, los ostiones juveniles de mayor talla también mostraron cambios en su comportamiento alimenticio después de la primera exposición a *G. catenatum*. Durante las

dos horas siguientes al inicio del bioensayo, los organismos mostraron un cierre parcial de valvas con la dieta mezclada de *I. galbana* + *G. catenatum* (6×10^3 cel mL⁻¹) y con la dieta de sólo *G. catenatum* (control tóxico). Además, al igual que en los ostiones juveniles de menor talla también se observó la producción activa de pseudoheces tanto en la dieta mixta *I. galbana* + *G. catenatum* (6×10^3 cel mL⁻¹) como en el control tóxico durante las primeras 6 h, después los organismos comenzaron a filtrar el alimento normalmente. Los ostiones alimentados únicamente con *I. galbana* (control no tóxico) mostraron un comportamiento de filtración normal removiendo la microalga durante todo el bioensayo.

7.3 Tasas de aclaramiento (TA) de *C. gigas*

7.3.1 TA de ostiones de 3 ± 1 mm

La tasa de aclaramiento (TA) de *C. gigas* disminuyó significativamente ($F = 74.8$, $p = 0.0$) en los dos tratamientos que consistieron en la mezcla de las dos microalgas: *I. galbana* 0.75×10^6 cel mL⁻¹ y *G. catenatum* (3×10^3 y 30×10^3 cel mL⁻¹), así como en los ostiones alimentados únicamente con *G. catenatum* 3×10^3 cel mL⁻¹ (control tóxico).

Como se observa en la figura 3, la tasa de aclaramiento mantiene una relación directa con la concentración de células del dinoflagelado. Esta tasa disminuyó significativamente ($p < 0.05$) con los dos tratamientos probados y el control tóxico, observándose el mayor efecto en la dieta mixta con 30×10^3 cel mL⁻¹ de *G. catenatum* (0.24 ± 0.08). Por ello, los organismos no removieron completamente el alimento de las unidades experimentales durante cada periodo de 24 h. El control positivo o control tóxico (solo *G. catenatum*), nos

permitió confirmar que los organismos ingieren al dinoflagelado en esta condición, aunque la TA es baja (fig. 3). Por otro lado, en relación a *I. galbana* aunque se utilizó el mismo número de células en los dos tratamientos y el control, al final del monitoreo de 24 h se encontró que *C. gigas* no alcanzó a remover toda la microalga en los tratamientos que contenían al dinoflagelado, disminuyendo significativamente la TA ($p < 0.05$). Sin embargo, la TA de los ostiones alimentados con *I. galbana* fue alta (0.96), lo que significa que los organismos removieron casi el 100 % en un periodo de 24 h. Estos resultados demuestran que el ostión ingirió al dinoflagelado y no seleccionó la ingestión de partículas dependiendo de su talla.

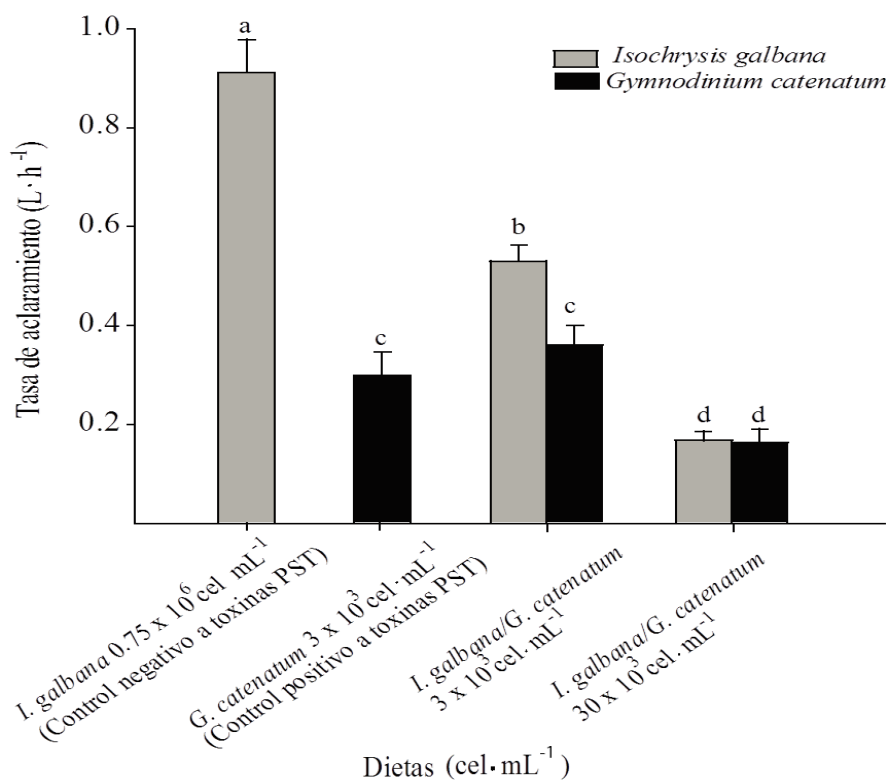


Figura 3. Tasa de aclaramiento (TA) de *C. gigas* de 3 ± 1 mm durante 24 h. Control negativo, *I. galbana* 0.75 x 10⁶ cel mL⁻¹; Control positivo, *G. catenatum* 3 x 10³ cel mL⁻¹. Tratamientos: dieta mixta *I. galbana* (0.75 x 10⁶ cel mL⁻¹) y *G. catenatum* (3 x 10³ cel mL⁻¹); dieta mixta *I. galbana* (0.75 x 10⁶ cel mL⁻¹) y *G. catenatum* (30 x 10³ cel mL⁻¹).

7.3.2 TA de ostiones de 50 ± 10 mm

La TA en ostiones de mayor talla, también fue alterada tanto en una exposición unialgal (sólo *G. catenatum*) como en una dieta mixta. En la figura 4 se muestran las TA de *C. gigas* bajo diferentes dietas después de 24 h de exposición. Los organismos alimentados sólo con *I. galbana* (control negativo) mostraron una TA de 2 ± 0.10 , lo que significa que removieron casi el 100 % de *I. galbana*; la TA de *I. galbana* en los ostiones alimentados con la dieta mixta *I. galbana* + *G. catenatum* (6×10^3 cel mL⁻¹) disminuyó a 1.9 ± 0.11 . Este comportamiento de disminución de la TA también se observó en los ostiones alimentados con sólo el dinoflagelado (control tóxico) 6×10^3 cel mL⁻¹ mostraron una TA significativamente baja de 1.32 ± 0.14 ; mientras que en los organismos con la dieta mixta (*I. galbana* + *G. catenatum* 6×10^3 cel mL⁻¹) la TA para *G. catenatum* también es baja de 1.11 ± 0.13 ($p < 0.05$). Es importante destacar que la TA del control tóxico fue similar a la de la dieta mixta. Los ostiones alimentados con el dinoflagelado (control tóxico y tratamientos) mostraron una baja actividad de alimentación en comparación con los alimentados con la microalga no tóxica (fig. 4). A las 24 h, los ostiones alimentados con *I. galbana* habían consumido por completo a las microalgas, mientras que los alimentados con dinoflagelados tóxicos no; no se registró muerte de organismos en las condiciones experimentales empleadas.

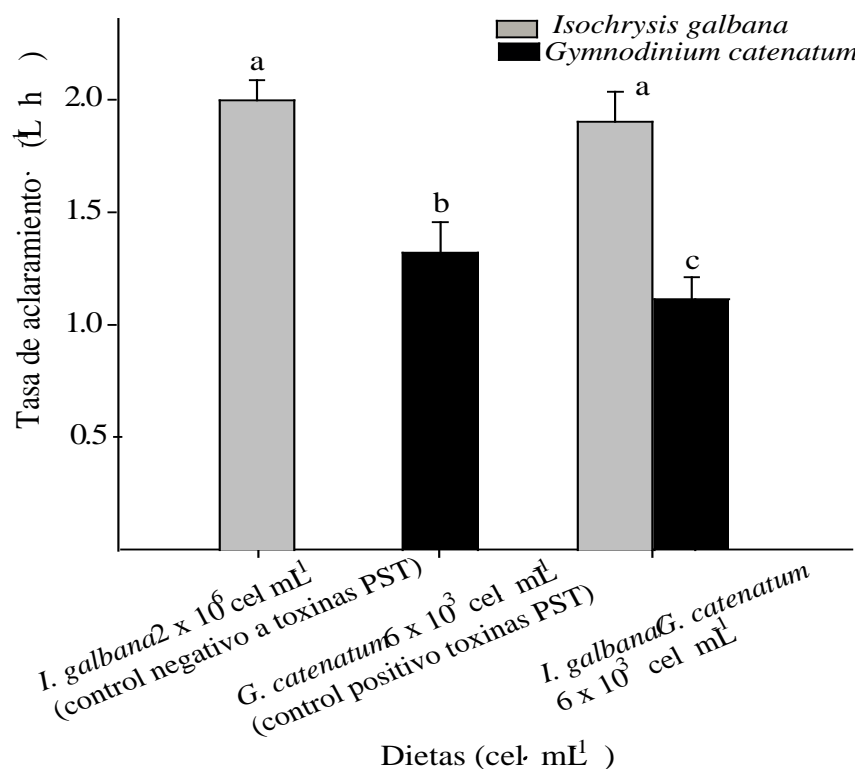


Figura 4. Tasa de aclaramiento (TA) de *C. gigas* de 50 ± 10 mm durante 24 h. Control negativo, *I. galbana* (2×10^6 cel mL⁻¹); Control positivo, *G. catenatum* (6×10^3 cel mL⁻¹); dieta mixta *I. galbana* (2×10^6 cel mL⁻¹) + *G. catenatum* (6×10^3 cel mL⁻¹).

7.4 Extracción de ARN total

Para la estandarización de la técnica de extracción de ARN total se probaron tres métodos: 1) SV Total RNA Isolation System, 2) Trizol® y 3) AGPC (Chomczynski y Sacchi, 1987). En las tablas VI y VII, se muestran los resultados y los criterios evaluados (respectivamente) para seleccionar el método de extracción utilizado, que finalmente fue el AGPC. En la figura 5 se muestra un gel de agarosa al 1% en TBE 1X (DEPC), en el que se puede observar la calidad e integridad del ARN obtenido. En ninguna muestra se observaron signos de degradación, y el análisis electroforético permitió identificar las

bandas de ARN correspondientes a las subunidades ribosomales. De este modo, considerando que la subunidad ribosomal 28S del ostión tiene una proporción de 2:1.5 con respecto a la subunidad 18S, se considera que el ARN obtenido es de excelente calidad.

Tabla VI. Criterios de evaluación de las metodologías de extracción de ARN total probadas.

Criterios de evaluación	Trizol (Invitrogen®)	SV Total RNA Isolation System (Promega©,USA)	Solución AGPC o TRI Reagent
Eficiencia	Alta	baja	alta
Contaminación con ADN	Baja	alta	Nula
Pureza	Intermedia	baja	Alta
Concentración	Alta	baja	Alta
Degradación	Baja	alta	Nula

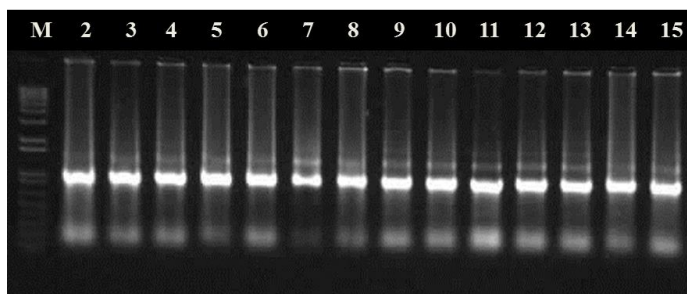


Figura 5. Perfil electroforético en gel de agarosa al 1% con TBE 1X de muestras de ARN total obtenidas mediante el método AGPC (Chomczynski y Sacchi, 1987). Líneas: 1, marcador de peso molecular (1 Kb plus Ladder); 2-15 muestras de ARN total del bioensayo de exposición aguda de *C. gigas* a *G. catenatum* aleatoriamente seleccionadas. Técnica de tinción: EtBr; condiciones de separación, 80 V, 45 min.

Tabla VII. Concentración y pureza del ARN total de las muestras obtenidas del bioensayo de exposición aguda de *C. gigas* a *G. catenatum*.

Tiempo de exposición (h)	Tratamientos	RNA (ng/ μ l)	Abs 260/280	Abs 260/230
0	CN	1236 \pm 1061	2.1	1.8
0	CP	1247 \pm 900	2.0	1.8
0	D1	1451 \pm 868	2.1	1.9
0	D2	858 \pm 82	2.1	2.0
3	CN	498 \pm 70	2.0	1.8
3	CP	599 \pm 139	1.9	1.8
3	D1	594 \pm 36	2.0	1.9
3	D2	507 \pm 16	2.0	1.8
6	CN	397 \pm 51	2.0	1.8
6	CP	440 \pm 148	2.1	1.8
6	D1	486 \pm 231	2.0	2.1
6	D2	412 \pm 205	2.0	2.1
12	CN	899 \pm 275	1.9	1.9
12	CP	697 \pm 231	2.0	1.9
12	D1	531 \pm 67	2.0	1.8
12	D2	779 \pm 209	1.9	1.8
24	CN	492 \pm 152	1.9	1.8
24	CP	630 \pm 102	1.8	1.8
24	D1	642 \pm 101	1.9	1.8
24	D2	610 \pm 86	1.9	1.8

Notación: CN: Control no tóxico, *I. galbana* 0.75×10^6 cel mL⁻¹; CP: Control tóxico, *G. catenatum* 3×10^3 cel mL⁻¹. D1: dieta mixta *I. galbana* (0.75×10^6 cel mL⁻¹) y *G. catenatum* (3×10^3 cel mL⁻¹); D2: dieta mixta *I. galbana* (0.75×10^6 cel mL⁻¹) y *G. catenatum* (30×10^3 cel mL⁻¹).

Por otro lado, se comprobó la ausencia de contaminación con ADN en todas las muestras, al realizar reacciones de PCR directas usando el ARN como templado y los oligonucleótidos universales para el gen 28S. Como se muestra en la figura 6, las reacciones realizadas bajo estas condiciones (ARN como templado) y sin templado (control negativo) no rindieron ningún producto de PCR (líneas 2, 4-8), a diferencia del control positivo (línea 3) en el que se usó como templado ADNc de *C. gigas*.

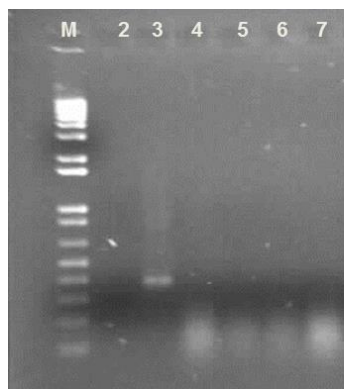


Figura 6. Perfil electroforético en gel de agarosa/Synergel al 1% en TBE 1X de productos de PCR del gen 28S ARNr obtenidos en la prueba de identificación de contaminación con ADN del ARN de *C. gigas* extraído mediante el método AGPC (Chomczynski y Sacchi, 1987). Líneas: 1, marcador de peso molecular (1 Kb plus Ladder) 2, control negativo (sin templado); 3, control positivo ADNc de *C. gigas*; 4-7, muestras de ARN total. Técnica de tinción: EtBr; condiciones de separación, 80 V/45 min.

Una vez que se verificó la ausencia de ADN en las muestras de ARN total, se sintetizó el ADN complementario (ADNc); la eficiencia de síntesis fue alta obteniéndose concentraciones entre los 2,300 y 2,500 ng μL^{-1} . El ADNc sintetizado se usó para hacer los análisis RT-PCR, con la finalidad de evaluar la expresión de los 25 genes propuestos.

7.5 Estandarización de las curvas de saturación y análisis de expresión mediante RT-PCR.

Las curvas de saturación llevadas a cabo para los análisis preliminares realizados mediante PCR punto final de todos los genes, permitieron identificar el ciclo, para programar la reacción de PCR, en el que la amplificación no alcanza la meseta de saturación, así como identificar aquellos genes que no mostraron expresión bajo las condiciones probadas. Cabe mencionar que los genes evaluados mostraron valores de saturación (mesetas) diferentes. En la figura 7 se muestran ejemplos de las curvas de

saturación obtenidas de tres genes evaluados: a) tubulina β (*tub*); b) 28S ARN ribosomal (28s ARNr); y c) superóxido dismutasa tipo cobre/zinc (*sod-cu/zn*).

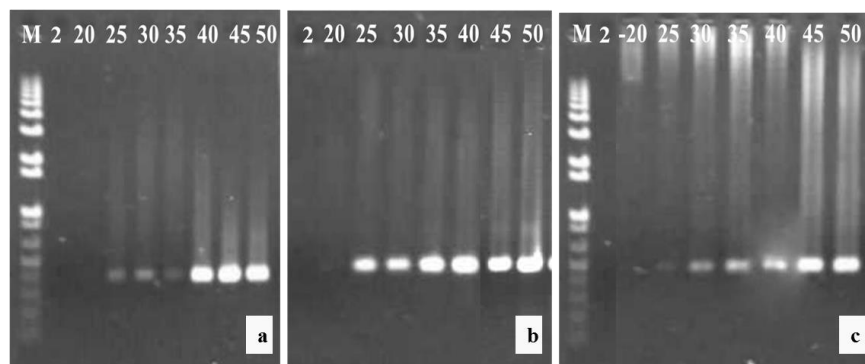


Figura 7. Perfil electroforético en gel de agarosa/Synergel® TBE al 1% de amplicones obtenidos en experimentos de saturación de PCR punto final para la evaluación de oligonucleótidos gen-específicos. Líneas: 1, marcador de peso molecular (1 Kb plus Ladder, Invotrogen); 2, (control negativo, sin templado); 20-50, ciclos de amplificación. Paneles: a, tubulina- β ; b, 28S ARNr ribosomal; c, superóxido dismutasa tipo cobre/zinc. Técnica de tinción: EtBr; condiciones de separación, 80 V/1 h.

De los 25 genes analizados en juveniles de *C. gigas* de 3 ± 1 mm bajo las condiciones de ensayo (agudo y subcrónico), se observó la amplificación solo en 16 de ellos, mientras que en los ocho genes restantes no se logró observar producto de síntesis en ningún tratamiento, dichos genes fueron: *hsp90*, *immunolectina B*, *lectina hepática*, β -*timosina*, *lisozima*, *inhibidor de proteinasas (Ser o Cys)*, *fosfatasa alcalina* y *glucanasa β 1-3*. Las gráficas del análisis de estos experimentos exploratorios del comportamiento de *C. gigas* a la exposición al dinoflagelado tóxico (por RT-PCR), se muestran en los anexos I y II. Con base en estos resultados, se realizó una selección de los 16 genes que se sobreexpresaron o reprimieron, así como los tratamientos y tiempos de exposición en los que se observó una mayor repuesta; estos genes seleccionados fueron considerados para los análisis de expresión mediante qPCR (los análisis se detallan en la sección 5.5.2).

7.6 Estandarización de la eficiencia de amplificación

Para determinar y estandarizar la eficiencia de amplificación en los análisis de expresión, se realizaron curvas estándar de los oligonucleótidos correspondientes a los 16 genes previamente seleccionados por RT-PCR y para otros tres genes involucrados en el sistema inmune. Las figuras 8 y 9 corresponden a ejemplos de las curvas estándar realizadas para cada uno de los genes analizados, y en estos casos en particular, para un gen de referencia (fig. 8) y un gen blanco (fig. 9).

Los valores de Ct se distribuyeron entre 22.5 (28s) y 28.29 para el gen de la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (*gapdh*), estos fueron menores que uno entre las repeticiones. Las curvas estándar exhibieron coeficiente de correlación (R^2) mayores a 0.98 y la eficiencia del qPCR varió de 95% a 100%. La especificidad de la amplificación de cada uno de los primers fue confirmada por el análisis de las curvas de disociación, las cuales mostraron un único producto durante la corrida de qPCR. En la fig. 10 se muestran las temperaturas de fusión de los genes de referencia que esta entre 82 y 85 °C. Además, los análisis electroforéticos mediante gel de agarosa/synergel® también mostraron una sola banda para todos los genes amplificados.

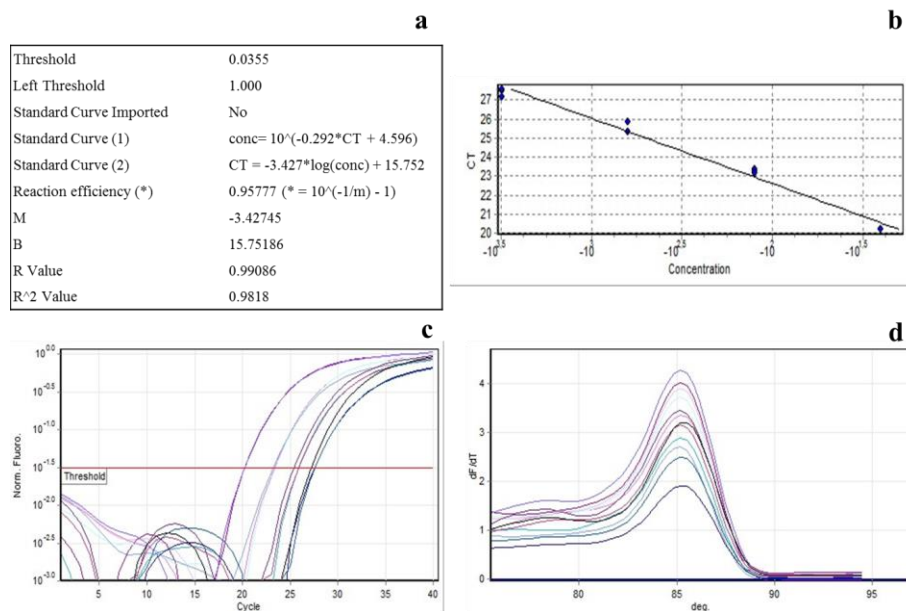


Figura 8. Curva estándar para el gen de referencia candidato actina (*act*). Paneles: **a**) valor umbral y eficiencia de amplificación, **b**) regresión lineal, **c**) curva de fluorescencia y **d**) curva de disociación en ostiones de 3 ± 1 mm de talla.

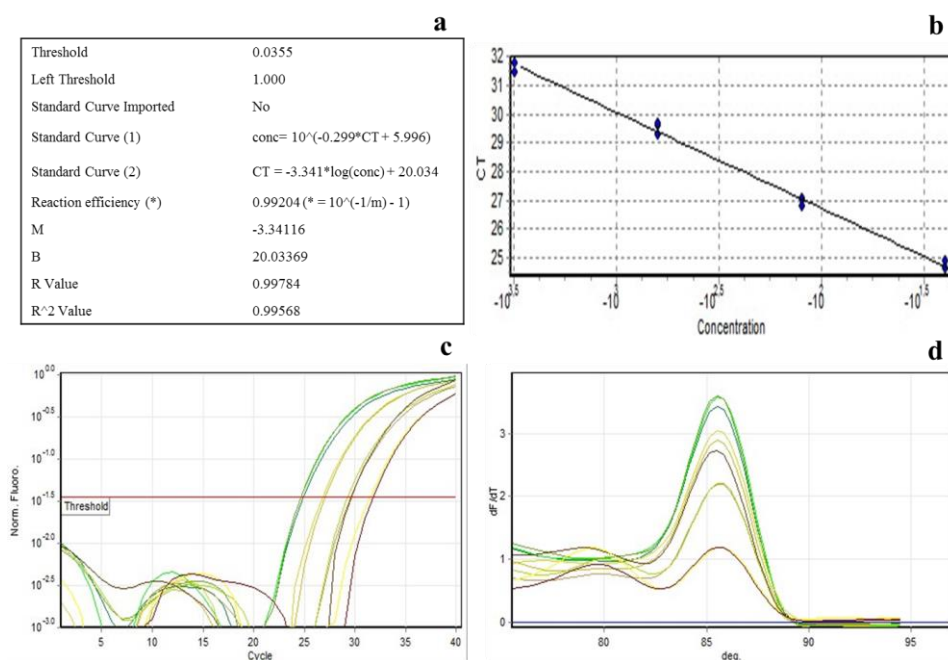


Figura 9. Curva estándar para el gen blanco *lps-β 1,3 glucano (lbpq)*. Paneles: **a**) valor umbral y eficiencia de amplificación, **b**) regresión lineal, **c**) curva de fluorescencia y **d**) curva de disociación en ostiones de 3 ± 1 mm de talla.

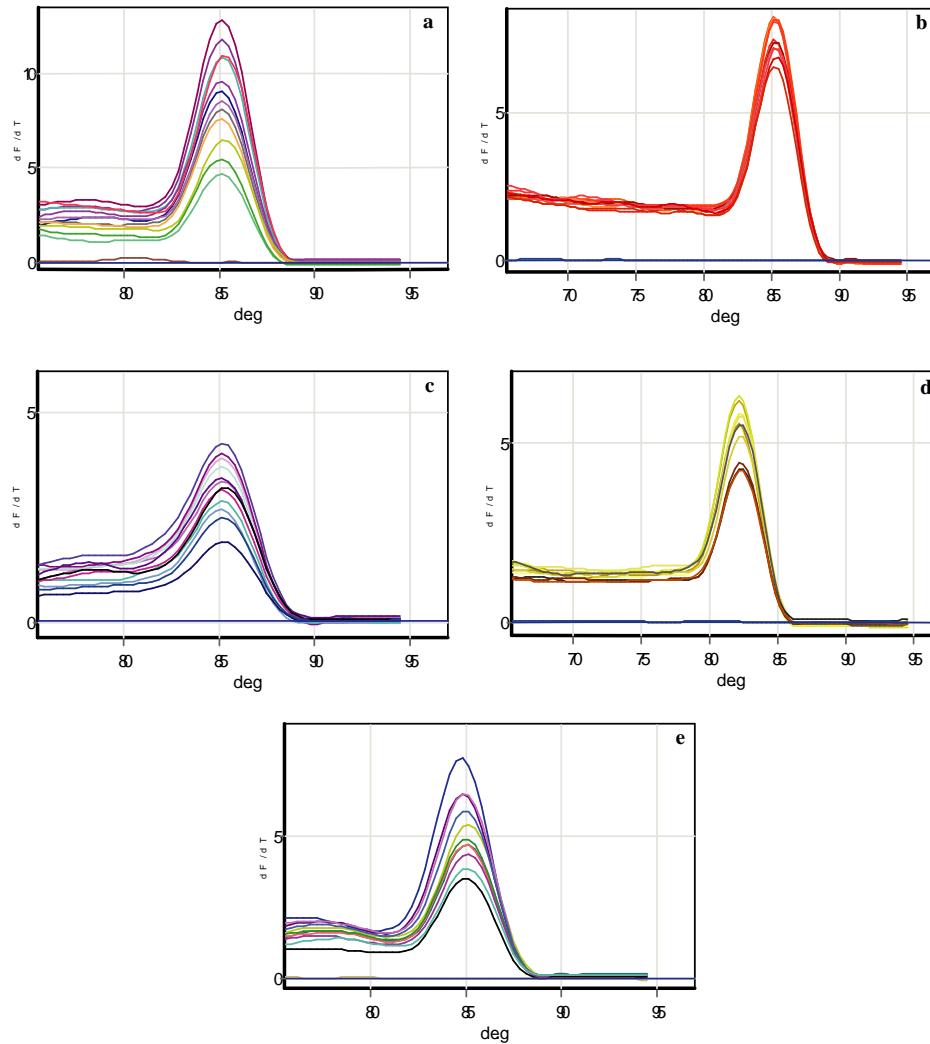


Figura 10. Curvas de disociación de (a) *tub β*, (b) *ef1-α*, (c) *act*, (d) *gapdh* y (e) *28s ARNr*.

7.7 Determinación de la estabilidad de los genes de referencia candidatos en juveniles de 3 ± 1 mm de *C. gigas*

Se determinó la estabilidad de la expresión de cinco genes de referencia (*tub β*, *ef1-α*, *act*, *gapdh* y *28s ARNr*) midiendo los niveles de expresión de ARN en muestras de ostión (organismos completos). Para cada muestra, se calculó la estabilidad de la expresión de cada gen utilizando la media geométrica de los valores Ct. Para realizar los análisis con el algoritmo GeNorm, los valores ct fueron convertidos a cantidades relativas, utilizando el método del Ct comparativo, mientras que para los análisis con el programa NormFinder,

fueron transformados a logaritmo natural. Por otro lado, para los análisis con el algoritmo BestKeeper, los valores ct fueron usados directamente.

7.7.1 Análisis GeNorm

Con este programa se realizaron dos análisis: primero utilizando la macro de Excel del programa de GeNorm (Vandesompele et al. 2002), los valores de los ct fueron convertidos a cantidades relativas, aplicando la fórmula del método del Ct comparativo, posteriormente, estos valores fueron introducidos en el programa para llevar a cabo el análisis. La estabilidad de la expresión (M) de cada gen de referencia candidato evaluado se muestra en la figura 11. Un valor de M bajo indica una expresión muy estable de ese gen bajo las condiciones del ensayo. Los genes con los valores de M más bajos y, por lo tanto, los más estables fueron: *28s ARNr* y *gapdh* con un valor de $M=0.08$. Los valores de M arriba de 1.5 indican que los genes son altamente variables en las condiciones probadas, por lo tanto, no podrían utilizarse como genes de referencia. Además, el programa GeNorm también determina el número óptimo de genes de referencia que se pueden usar, mediante el cálculo de la variación pareada (V) entre los genes candidatos. Dicho factor es obtenido por el análisis de los cambios en el factor de normalización, por la adición sucesiva del gen de referencia candidato más estable (NFN y NFN+1). Los análisis de variación para estos genes arrojaron valores de 0.095 para V_{2/3}, 0.096 para V_{3/4} y 0.090 para V_{4/5} (fig. 12). Una variación grande indica que el gen añadido tiene un efecto significativo y debe ser incluido para el cálculo de un factor de normalización confiable. En nuestro caso, se pudo observar un pequeño incremento en el valor de V_{3/4}, que no fue significativo al añadir el tercer gen, por lo tanto, no fue necesario que el factor de normalización considerara tres

genes de referencia. Una variación mayor a 0.15 indica que el gen o genes no pueden utilizarse como genes de referencia solos, sino que tendría que incluir otros genes para conseguir un factor de normalización correcto y así disminuir el error de cuantificación.

El segundo análisis que se realizó fue utilizando los datos de ct sin transformar a cantidades relativas, estos fueron directamente introducidos como valores de ct utilizando también el programa de GeNorm en la página web: RefFinder (<http://www.leonxie.com/referencegene.php?type=reference#>) (fig. 13 a).

Los genes con los valores de M más bajos y, por lo tanto, los más estables también fueron: *28s ARNr* y *gapdh* con un valor de $M = 1.31$.

7.7.2 Análisis NormFinder

Para realizar este análisis también se probó un macro del programa en Excel, con el que los datos fueron transformados a logaritmo natural, y la variación entre grupos se midió al asignar categorías a las muestras (según el tratamiento y tiempo de exposición), de forma que el gen más estable sería aquel cuyos valores se distribuyan más cercanamente a cero (también se realizó un análisis a través de la página web de Redfinder). Los resultados entre estos dos métodos coincidieron, por tal razón en este documento solo se presenta la gráfica de estabilidad que mostró Redfinder. Los genes con menor variación fueron: *gapdh* (0.77) y *tub β* (1.24). Por lo tanto, los resultados de NormFinder mostraron que el mejor par de combinaciones de genes de referencia fue *gapdh* y *tub β* con un valor de 0.003 (Fig. 13a).

7.7.3 Análisis de BestKeeper

Con el fin de comparar los resultados de los algoritmos GeNorm y NormFinder, los datos también se analizaron utilizando el método BestKeeper que es independiente de clasificación. En la figura 13 b, se muestra el índice de estabilidad de BestKeeper, con este programa se encontró al igual que con GeNorm, los genes con mayor estabilidad fueron 28S ARNr (1.81) y *gapdh* (1.91), por lo tanto, adecuados para la normalización de los datos.

Con base al consenso de los tres programas utilizados, se decidió utilizar como genes de referencia 28S ARNr y *gapdh* para los análisis de expresión por qPCR en muestras provenientes de juveniles de talla pequeña.

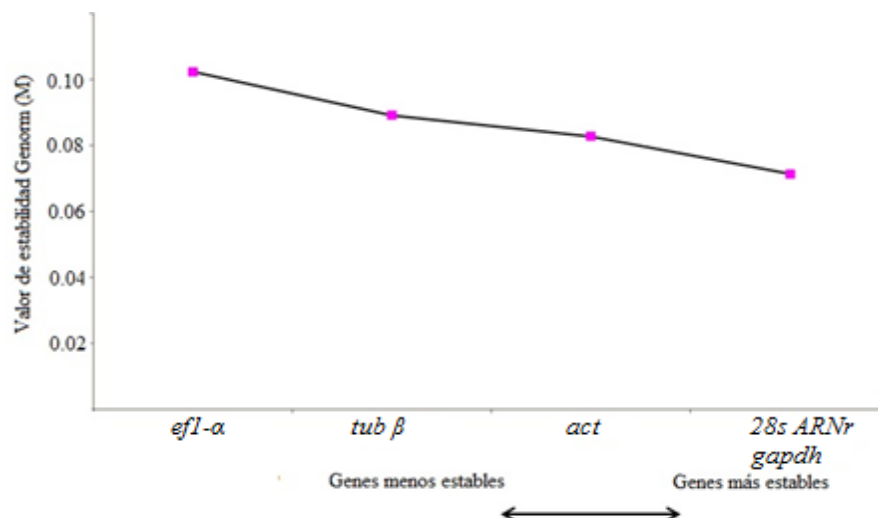


Figura 11. Promedio de la estabilidad de la expresión génica (M) de genes candidatos de referencia en *C. gigas* de 3 ± 1 mm calculados con el software GeNorm. El valor de M bajo indica la media de los genes más estables (n = 18).

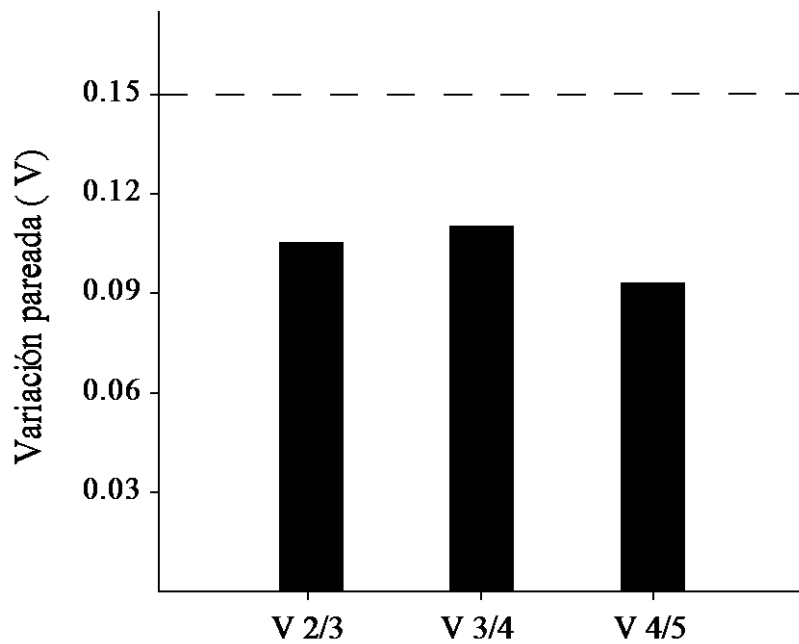


Figura 12. Determinación del número óptimo de genes de referencia para la normalización de análisis de la variación pareada (V) utilizando software GeNorm. Los valores indican la magnitud del cambio en el factor de normalización después de la inclusión de un gen de referencia adicional (n = 18).

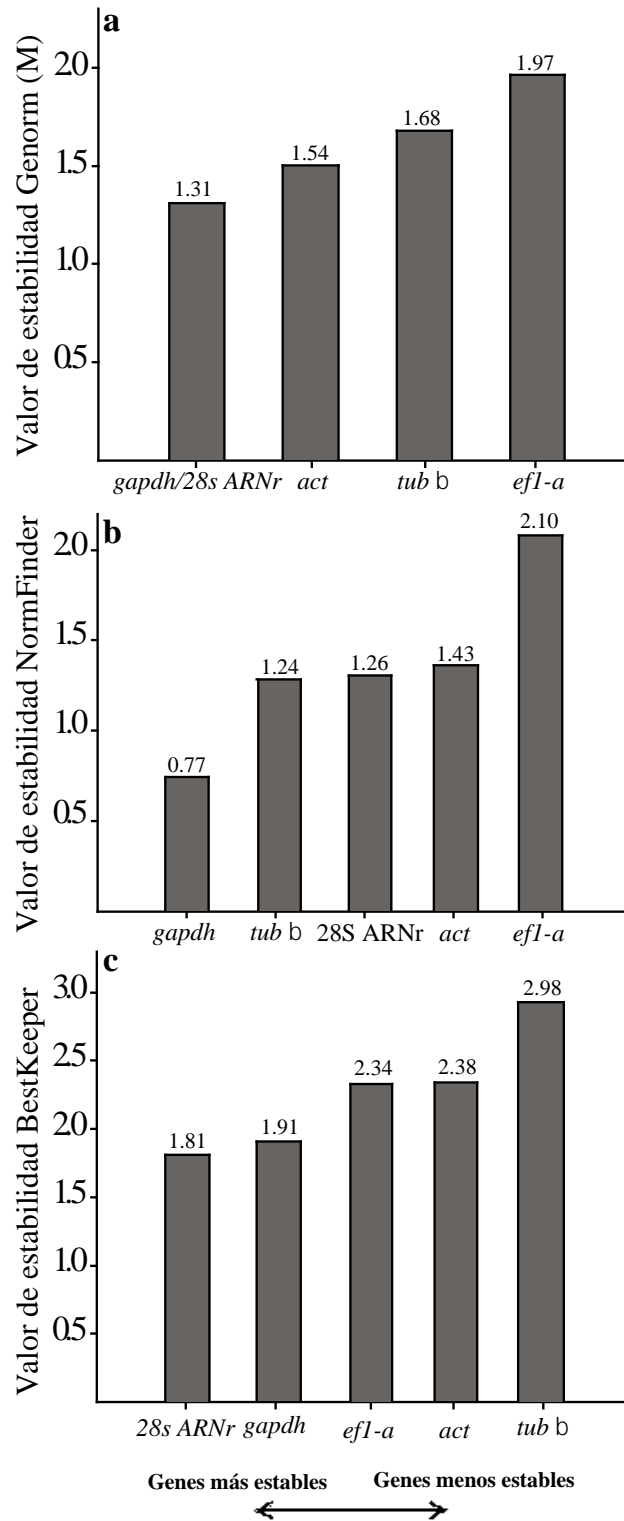


Figura 13. Promedio de la estabilidad de la expresión génica de genes candidatos de referencia, en *C. gigas* de 3 ± 1 mm calculados con GeNorm (a), BestKeeper (b) y NormFinder (c) (n = 18).

7.8 Análisis cuantitativo de la expresión de genes de respuesta a estrés, defensa antioxidante, sistema inmune y detoxificación celular de juveniles de 3 ± 1 mm de *C. gigas*.

Se estudiaron las respuestas aguda (horas) y subcrónica (días) de *C. gigas* alimentado con células de *G. catenatum*, a través del análisis de los niveles de expresión de genes que codifican proteínas de estrés como glutamina sintetasa (GS), de defensa antioxidante como superóxido dismutasa tipo Cu/Zn (SOD-Cu/Zn), de detoxificación celular como glutatión S-transferasa (GST-S) y citocromo p450 isoforma CYP356A1 y de respuesta inmune como la Proteína de unión a LPS y β -1,3 glucano (LGBP) (fig. 14 y 15). En términos generales, las variaciones en los niveles de expresión de los genes analizados resultó ser dependiente del tiempo y de la concentración de células tóxicas. Los análisis de expresión se realizaron utilizando muestras de ADNc generadas a partir del ARN extraído del homogeneizado de cinco organismos completos (por triplicado). Los niveles de expresión de cada gen blanco, en las condiciones experimentales probadas (ostiones alimentados con mezclas *I. galbana*/*G. catenatum*) y de control positivo (ostiones alimentadas únicamente con *G. catenatum*), se compararon con la condición “control no tóxico o control negativo a toxina” (ostiones alimentadas con *I. galbana*) considerada “línea base”.

7.8.1 Bioensayo de exposición aguda con ostiones juveniles de 3 ± 1 mm de talla.

En todos los genes analizados, se produjeron cambios en el nivel de transcritos como respuesta de la exposición aguda a los dinoflagelados tóxicos (fig. 14).

El nivel de transcritos del gen *sod-cu/zn* en los ostiones alimentados con la mezcla de 3×10^3 cel mL⁻¹ de *G. catenatum*, aumentó 0.31 veces por encima de la línea base en las primeras 12 h de exposición, manteniéndose así durante 24 h. Por el contrario, la abundancia de transcritos de dicho gen en los ostiones alimentados con la mezcla de 30×10^3 cel mL⁻¹ de *G. catenatum* disminuyó en las primeras horas (0.4 veces por debajo de la línea base), y alcanzó niveles de expresión igual que el control a las 24 h de exposición (fig. 14a). El nivel de transcritos en los ostiones alimentados sólo con *G. catenatum* (3×10^3 cel mL⁻¹) aumentó significativamente ($p < 0.05$) después de 12 h de exposición 1.1 veces por encima de la línea base.

Los niveles de transcritos de *gst-s* disminuyeron en los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* (3×10^3 cel mL⁻¹) y en los alimentados con solo *G. catenatum* (control positivo) en las primeras 6 h. Un incremento significativo ($p < 0.05$) en el nivel de expresión, (fig. 14b) se observó en todos los tratamientos después de 12 h post-exposición. El mayor nivel del transcritos se observó a las 12 h en la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* (3×10^3 cel mL⁻¹) con 2.6 veces por arriba de la línea base y a las 24 h en los organismos alimentados con solo *G. catenatum* (3×10^3 cel mL⁻¹) con 2.3 veces por arriba de la línea base.

El gen *gs* mostró un aumento en los niveles de expresión durante las primeras 6 h de exposición en los organismos alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* (3×10^3 cel mL⁻¹) y aquellos alimentados solo con *G. catenatum* (Fig. 14c). Sin embargo, a las 12 h, el nivel de expresión de estos tratamientos regresó a nivel basal (organismos alimentados con el control *I. galbana*), mientras que el nivel de transcritos de dicho gen en los ostiones alimentados con la dieta mixta *I. galbana* + *G. catenatum* (30×10^3 cel mL⁻¹) incrementó 0.6 veces; una vez alcanzadas las 24 h de exposición, se observó una disminución en los niveles de expresión en todos los tratamientos ($p < 0.05$) (Fig. 14c).

En el caso del gen *lgbp* el nivel de transcripción incrementó significativamente ($p < 0.05$) a las 6 horas post-exposición en los organismos tratados; observando un incremento de 4.8 veces por encima de la línea base (fig. 14d), mientras que a las 12 h post-exposición, el nivel de transcritos se mantuvo entre 2.3-3.3 veces por encima de dicha línea. El mayor nivel de expresión se observó en todos los tratamientos a las 24 h post-exposición, cabe destacar que el mayor incremento 18.43 veces por arriba del nivel basal, se observó en los ostiones alimentados sólo con *G. catenatum* (control positivo o tóxico).

El efecto de *G. catenatum* a una concentración de 3×10^3 cel mL⁻¹ en la transcripción de *cpy356A1*, así como en el control tóxico fue un incremento durante las primeras 6 h, alcanzando valores entre 1.6 y 1.2 por encima de la línea base (respectivamente), manteniendo dicho nivel hasta las 12 h. Sin embargo, el nivel de transcripción de organismos expuestos a la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* (30×10^3 cel mL⁻¹) aumentó 1.5 veces a las 12 h ($p < 0.05$). En todos los tratamientos, los niveles de expresión volvieron a niveles basales después de 24 h de exposición (fig. 14e).

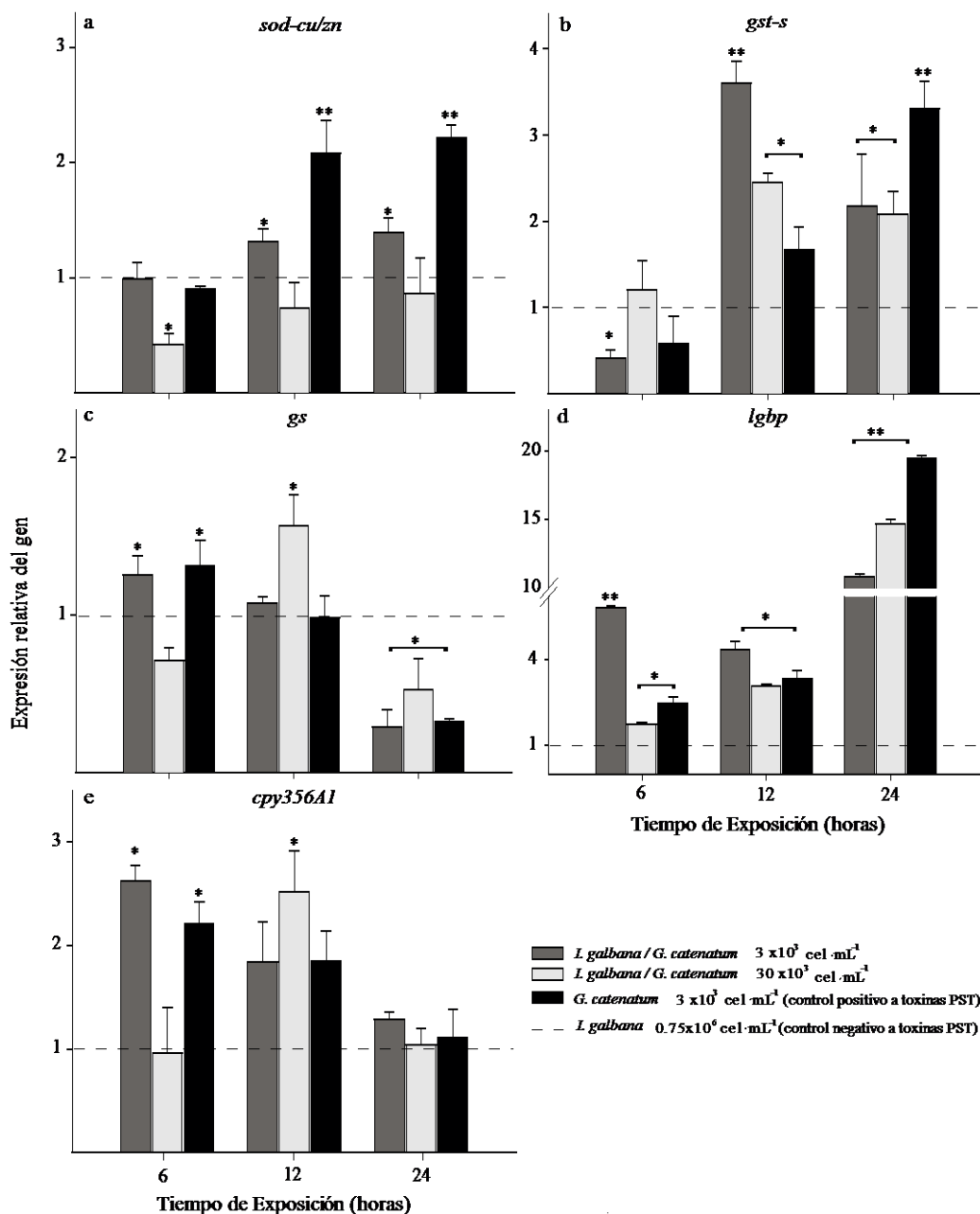


Figura 14. Análisis de la expresión relativa (qPCR) de los genes: **a)** superóxido dismutasa cobre/zinc (*sod-cu/zn*), **b)** glutatión S transferasa (*gst-s*), **c)** glutamina sintetasa (*gs*), **d)** proteína de unión a LPS y β -glucanos (*lgbp*), y **e)** del citocromo P450 isoforma *cpy356A1*. Los valores de expresión se muestran como expresión normalizada respecto a los genes de referencia *28s ARNr* y *gadph* y relativo al calibrador (línea punteada). Las barras representan la desviación estándar (SD), mientras los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos y el control negativo (* $p < 0.05$, ** $p=0.001$; HSD de Fisher).

7.8.2 Bioensayo de exposición subcrónica con ostiones juveniles de 3 ± 1 mm de talla.

En este tipo de bioensayo se observó que el nivel de transcripción de los genes implicados en la línea de defensa antioxidante y detoxificación celular (*sod-cu/zn* y *gst-s*, respectivamente), en todos los tratamientos incrementó a los 7 días post-exposición disminuyendo a los 14 días (fig.15a). El nivel de transcritos de *sod-cu/zn* aumentó significativamente en todos los tratamientos ($p < 0.05$): 10 veces por arriba de la línea base en los organismos alimentados la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* (3×10^3 cel mL⁻¹), 71 veces en aquellos alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* (30×10^3 cel mL⁻¹) y 18 veces en los alimentados con el control tóxico (solo *G. catenatum*, 3×10^3 cel mL⁻¹); el nivel de expresión disminuyó a los 14 días post-exposición, sin embargo, en todos los casos se mantuvo por encima del valor del control.

El efecto de *G. catenatum* a una concentración de 3×10^3 cel mL⁻¹ en la transcripción de *gst-s* fue un incremento de 3 veces, 15 veces con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* (30×10^3 cel mL⁻¹) y 11 veces con el control tóxico. A los 14 días de exposición el nivel de expresión disminuyó al valor de la línea basal con la densidad más baja de *G. catenatum*, pero permaneció sobreexpresado (5 veces) con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* 30×10^3 cel mL⁻¹ (Fig. 15b). Así mismo, el nivel de transcritos de *gst-s* aumento significativamente ($p < 0.05$) a los 7 días post-exposición en todos los tratamientos; 4 veces con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* de 3×10^3 cel mL⁻¹, 5 veces con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* 30×10^3 cel mL⁻¹ y 8 veces en el control tóxico (Fig. 15c). En cambio, dicho nivel disminuyó con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* 3

$\times 10^3$ cel mL⁻¹ y en el control tóxico, pero a los 14 días post-exposición aumentó 13 veces con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* 30×10^3 cel mL⁻¹.

En el caso del gen *lgbp*, el efecto de la exposición al dinoflagelado tóxico, presentó un comportamiento muy particular (Fig. 15d). Las diferencias se relacionan con la cantidad de células tóxicas en el sistema del bioensayo; se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* 30×10^3 cel mL⁻¹ a los 7 y 14 días (12 veces por arriba de la línea de base). El nivel de expresión de este gen se mantuvo por encima del nivel basal (3 veces) en los organismos alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* 3×10^3 cel mL⁻¹, y se reprimió en los organismos alimentados con el control tóxico al finalizar el periodo de exposición (día 14).

El gen *cpy356A1* mostró un aumento significativo ($p < 0.05$) en los organismos alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* 30×10^3 cel mL⁻¹, de 15 a 35 veces en los días 7 y 14 respectivamente, en comparación con los alimentados con *I. galbana* (fig. 15e). El nivel de expresión en los organismos alimentados solo con el control tóxico incrementó 14 veces por arriba de la línea basal en el día 7, disminuyendo el día 14 pero manteniéndose 6 veces por arriba de la línea basal. Los resultados indican que en *C. gigas* la transcripción de estos 5 genes se afecta por la presencia del dinoflagelado tóxico. La magnitud de este efecto depende del tiempo de exposición y de la concentración de células tóxicas, así como de la presencia de una segunda microalga en la dieta.

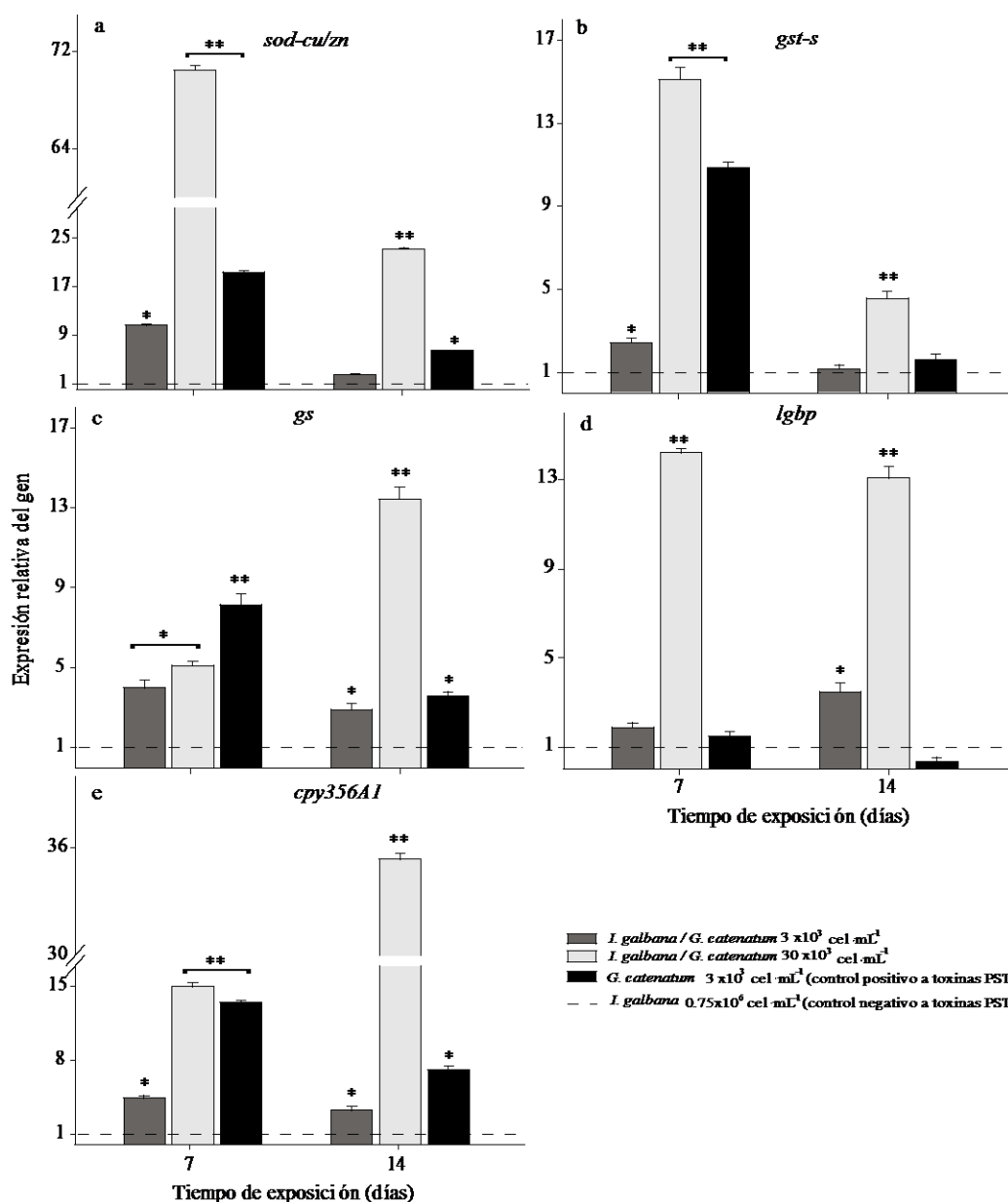


Figura 15. Análisis de la expresión relativa (qPCR) de los genes: a) superóxido dismutasa cobre/zinc (*sod-cu/zn*), b) glutatión S transferasa (*gst-s*), c) glutamina sintetasa (*gs*), d) proteína de unión a LPS y β -glucanos (*lgbp*), y e) del citocromo P450 isoforma *cpy356A1*. Los valores de expresión se muestran como expresión normalizada con los genes de referencia *28s ARNr* y *gapdh* y relativo al calibrador (línea punteada). Las barras representan la desviación estándar (SD), mientras que los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos y el control negativo (* $p < 0.05$, ** $p = 0.001$; HSD de Fisher).

7.9 Análisis cuantitativo de la expresión de genes involucrados en la regulación del ciclo celular, citoesqueleto, inflamación, apoptosis, cadena respiratoria y regulación proteica de juveniles de 3 ± 1 mm de *C. gigas*.

Por otra parte, se analizó el efecto de la exposición (aguda y subcrónica) de *C. gigas* a *G. catenatum* en los niveles de expresión de genes involucrados en: a) la regulación del ciclo celular: Factor 1 de ensamblaje de cromatina subunidad p55 (*p55*), Proteína p21 (*p21*), Factor de elongación 2 (*ef2*) y proteína supresora de tumores (*p53*); b) la estabilidad del citoesqueleto: actina (*act*), tubulina β (*tub β*); c) en procesos inflamatorios: caspasa 1 (*caspl*); d) cadena respiratoria: citocromo C oxidasa (*coi*) y e) de regulación proteica: tripsina (*tryp*) (fig. 16). Las muestras derivadas del bioensayo agudo fueron inicialmente analizados mediante de RT-PCR semicuantitativo, los resultados obtenidos se muestran en el anexo III.

En el presente trabajo, nos enfocamos a analizar y describir a detalle los cambios en el nivel de expresión durante el período de exposición sub-crónica (14 días) a través de análisis cuantitativos por qPCR.

7.9.1 Genes del ciclo celular

En el caso de los genes involucrados en la regulación del ciclo celular, se puede observar que el nivel de transcripción el gen que codifica *p55* aumenta significativamente ($p < 0.05$) en los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* (3

$\times 10^3$ cel mL⁻¹) después del primer día de exposición (fig. 16a). Por otro lado, en una exposición sub-crónica los valores de transcripción más altos se presentaron en el día 7 en los ostiones alimentados solo con el control tóxico con 3 veces por arriba de la línea basal, y en la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* 3×10^3 cel mL⁻¹ con 1.5 veces. En cambio, el nivel de transcripción aumentó significativamente en los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* (30×10^3 cel mL⁻¹) con 5 veces por arriba de la línea base para el día 14; en los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* (3×10^3 cel mL⁻¹) el nivel de expresión disminuyó hasta casi alcanzar el nivel basal 0.5 veces por arriba de dicho nivel y, por último, el nivel de transcripción en los ostiones alimentados solo con *G. catenatum* no vario en relación con la línea basal (fig. 16b).

En general, los transcritos del gen que codifica la proteína *p21* se incrementó en todos los tratamientos, de manera significativa ($p < 0.05$) en las muestras de ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* (30×10^3 cel mL⁻¹) con 4 veces por arriba de la línea basal. En la exposición sub-crónica se encontró que la expresión de este gen aumentó significativamente ($p < 0.05$) alcanzando niveles más altos al día 7, principalmente en los organismos alimentados con el control tóxico con 5 veces arriba del nivel basal, y en la dieta mixta con 3×10^3 cel mL⁻¹ del dinoflagelado con 4.5 veces. El nivel de expresión para dicho gen disminuyó hasta el nivel basal en los organismos alimentados con el control tóxico al día 14; en los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* (3×10^3 cel mL⁻¹), y con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* (30×10^3 cel mL⁻¹) el nivel de transcritos incrementó significativamente ($p < 0.05$) 16 veces por arriba del nivel basal (Fig. 16b).

En el caso del gen *ef2*, el nivel de transcritos aumentó en los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* (3×10^3 cel mL⁻¹) y con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* (30×10^3 cel mL⁻¹) alrededor de 3 veces durante el primer día de exposición ($p < 0.05$). El incremento en la transcripción de dicho gen fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* (30×10^3 cel mL⁻¹) con 12 veces arriba del nivel basal, en los organismos alimentados con el control tóxico (solo *G. catenatum*) con 5 veces y en los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* (3×10^3 cel mL⁻¹) con 4 veces por arriba del nivel basal al día 7 de exposición (Fig. 16 c). El nivel de transcrito disminuyó tanto en los ostiones alimentados con las 2 dietas mixtas como con el control tóxico o positivo, sin embargo siguieron permaneciendo por arriba del nivel basal (es decir sobreexpresados); la dieta mixta de *I. galbana* + *G. ctatenatum* (30×10^3 cel mL⁻¹) fue el tratamiento que continuó con una mayor sobreexpresión 4 veces por arriba del nivel basal al final del experimento día 14 de exposición. Para el gen *p53*, se observó sobreexpresión en los ostiones alimentados con ambas dietas mixtas así como en el control tóxico a partir del día 3. La mayor sobreexpresión se encontró en el día 7 principalmente en los ostiones alimentados con las dietas mixtas (Fig. 16d). Sin embargo, se observó represión de este gen en los ostiones alimentados tanto con las dietas mixtas como con el control tóxico en el día 14.

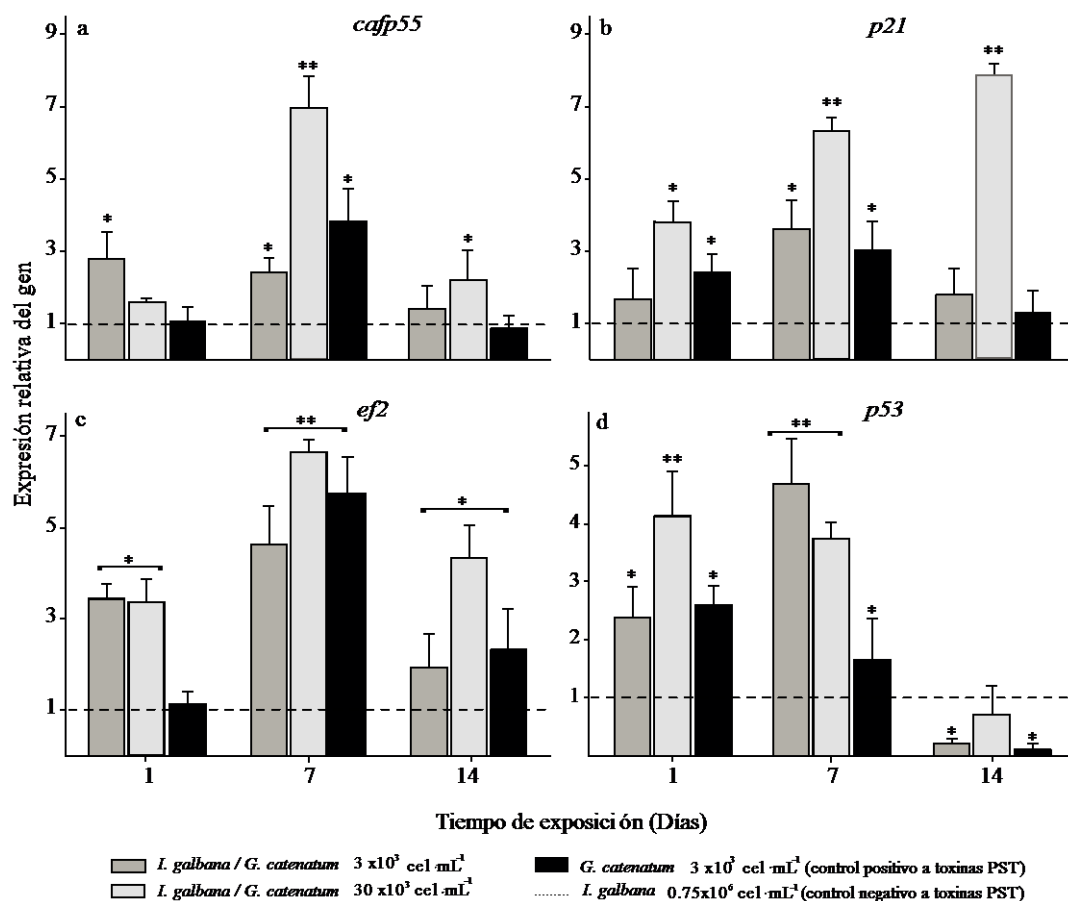


Figura 16. Análisis de la expresión relativa (qPCR) de los genes de *C. gigas* bajo exposición subcrónica a *G. catenatum*. Paneles: a) Factor 1 de ensamblaje de cromatina subunidad p55 (*p55*), b) Proteína p21 reguladora del ciclo celular (*p21*), c) Factor de elongación 2 (*ef2*), d) Proteína p53 (*p53*). Los valores de expresión se muestran como expresión normalizada con los genes de referencia 28S ARNr y *gapdh* y relativo al calibrador (línea punteada). Las barras representan la desviación estándar (SD) y los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos y el control negativo (* $p < 0.05$, ** $p = 0.001$; HSD de Fisher).

7.9.2 Genes del citoesqueleto y procesos inflamatorios

La transcripción de *act* se incrementó significativamente ($p < 0.05$) en organismos alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* (3×10^3 cel mL⁻¹) y en organismos alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* (30×10^3 cel mL⁻¹) con 3 y 4.5 veces arriba del nivel basal respectivamente en el primer día de exposición.

En un periodo de mayor de exposición (7 días) la transcripción de *act* se incrementó a 3.5 y 5 veces respectivamente en los ostiones alimentados con 3×10^3 y 30×10^3 cel mL⁻¹ de *G. catenatum*, este último permanece así hasta el final del experimento (día 14); en los ostiones alimentados con el control tóxico (sólo con *G. catenatum*) incrementó 3 veces a los 7 d y disminuyó hasta alcanzar el nivel basal a los 14 d (fig. 17a).

Así mismo, el nivel de transcritos de *tub β* se incrementó en los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* (3×10^3 cel mL⁻¹) y los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* (30×10^3 cel mL⁻¹) 1.5 y 2 veces respectivamente. No obstante, ante un periodo más prolongado de exposición la transcripción se reprime considerablemente en los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* (30×10^3 cel mL⁻¹) lo que implica hasta 0.7 veces por abajo del nivel basal, manteniéndose así hasta el día 14. En los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* (3×10^3 cel mL⁻¹), el nivel de transcrito de *tub β* se mantuvo sobreexpresado después de 7 días de exposición, pero aumentó su transcripción significativamente ($p < 0.05$) al día 14 de exposición, al igual que en los ostiones alimentados sólo con *G. catenatum* 2 veces por arriba del nivel basal (fig. 17 b).

En relación a la transcripción de *casp 1*, esta se mantuvo en niveles basales durante el primer día de exposición al dinoflagelado, sin embargo, tras 7 días de exposición se observó un incremento significativo ($p < 0.05$) en los ostiones alimentados con los dos tratamientos y el control tóxico, siendo mayor con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* (30×10^3 cel mL⁻¹) con 18 veces por arriba del nivel basal y en los organismos alimentados con el control tóxico con 14 veces. El nivel de transcritos disminuyó hasta

igualar el nivel basal en los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* (3×10^3 cel mL⁻¹) y en los alimentados con el control tóxico (sólo *G. catenatum*), mientras que en los organismos alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* (30×10^3 cel mL⁻¹) el gen permaneció sobreexpresado 7 veces por encima del nivel basal (fig. 17c).

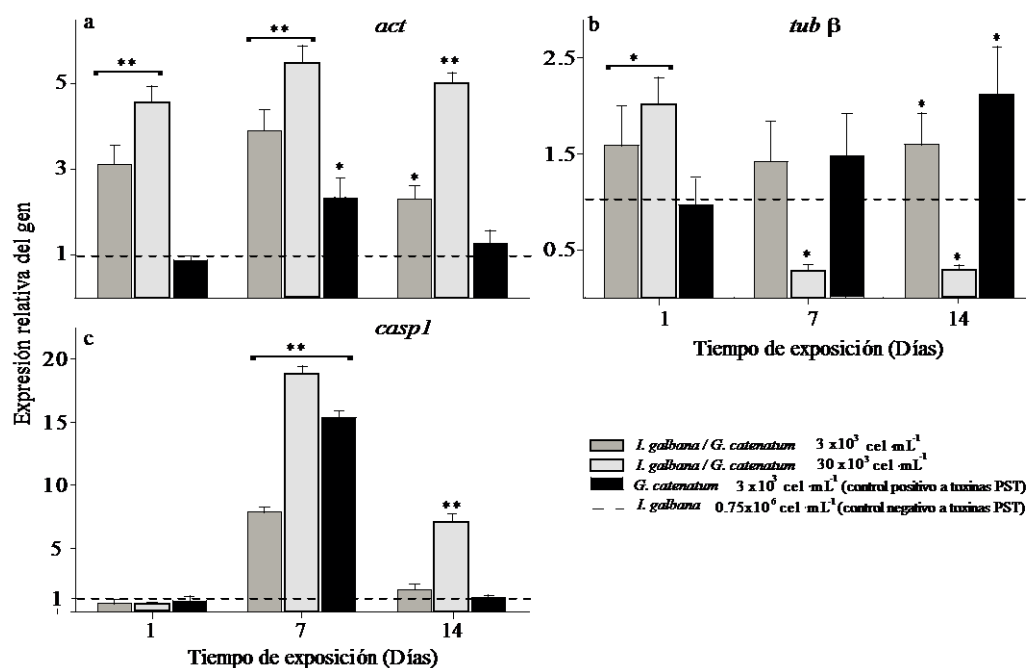


Figura 17. Análisis de la expresión relativa (qPCR) de los genes de *C. gigas* relacionados con el citoesqueleto y sistema inmune, bajo exposición a *G. catenatum*. Paneles: a) Actina (*act*); b) Tubulina β (*tub* β), c) Caspasa 1 (*casp1*). Los valores de expresión se muestran como expresión normalizada con los genes de referencia 28S ARNr y *gapdh* y relativo al calibrador (línea punteada). Las barras representan la desviación estándar (SD) y los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos y el control negativo (* $p < 0.05$, ** $p = 0.001$; HSD de Fisher).

7.9.3 Gen de la citocromo oxidasa I (*coi*) y de tripsina (*tryp*)

Por otro lado, también se monitoreo la expresión de gen *coi*, encontrándose que a los 7 d de exposición el nivel de transcritos se incrementó ($p < 0.05$) significativamente con 3×10^3 cel mL⁻¹ (2 veces) y 30×10^3 cel mL⁻¹ (3 veces) de *G. catenatum* por encima de la

línea basal. En cambio, la transcripción se reprimió significativamente (valores por debajo de la línea basal) después de 14 días de exposición al dinoflagelado (fig. 18 a). Finalmente, el gen *tryp*, mostró un comportamiento similar al del *coi*, con una sobreexpresión con ambos tratamientos a los 7 d de exposición, siendo mayor con $30 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$ (7 veces) (fig. 18 b).

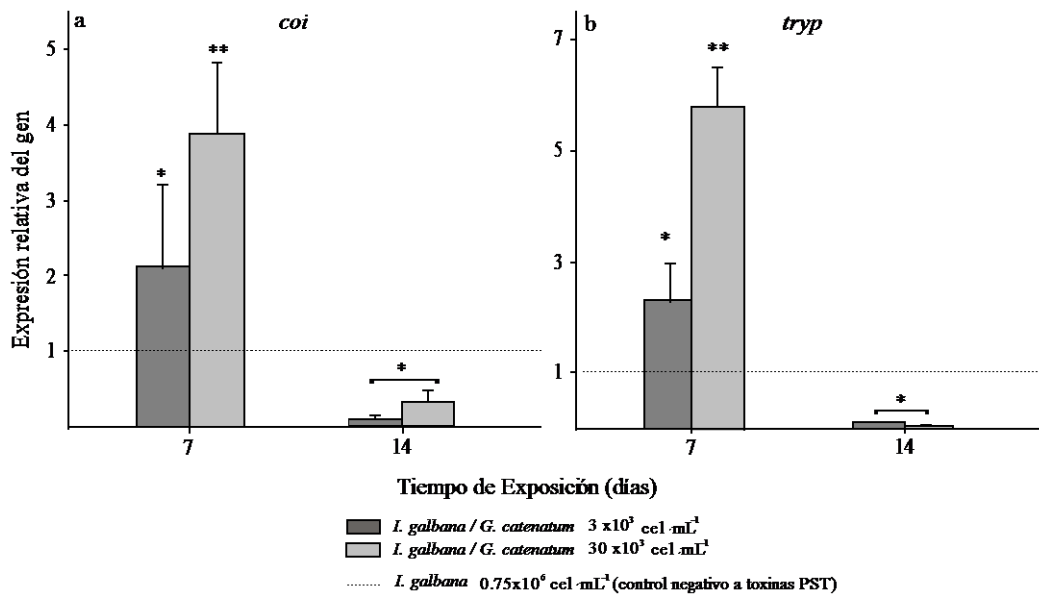


Figura 18. Análisis de la expresión relativa (qPCR) de los genes de *C. gigas* bajo exposición a *G. catenatum*. Paneles: **a**) citocromo oxidasa I (*coi*), **b**) tripsina (*tryp*). Los valores de expresión se muestran como expresión normalizada con los genes de referencia *28s ARNr* y *gapdh* y relativo al calibrador (línea de puntos). Las barras representan la desviación estándar (SD), los asterisco indican diferencias significativas entre los tratamientos y el control negativo (* $p < 0.05$, ** $p = 0.001$; HSD de Fisher).

7.10 Determinación de la estabilidad de los genes de referencia candidatos en glándula digestiva y hemocitos en juveniles de 50 ± 10 mm de *C. gigas*.

Se determinó la estabilidad de la expresión de cinco genes de referencia (*tub β* , *efl- α* , *act*, *gapdh* y *28s ARNr*) como se menciona en el apartado 6.10, midiendo sus niveles de expresión en muestras de ADNc de glándula digestiva de ostiones alimentados con una dieta mixta de *I. galbana* (2×10^6 cel mL⁻¹) + *G. catenatum* (6×10^3 cel mL⁻¹), comparando con un control no tóxico de *I. galbana* (2×10^6 cel mL⁻¹) y un control tóxico dieta con solo *G. catenatum* (6×10^3 cel mL⁻¹). Para cada muestra, se calculó la estabilidad de la expresión de cada gen utilizando la media geométrica de los valores Ct. Los análisis se realizaron directamente en la página web: RefFinder (<http://www.leonxie.com/referencegene.php?type=reference#>) utilizando los programas GeNorm, NormFinder y BestKeeper.

7.10.1 Análisis Genorm

Con el programa GeNorm, se estimó la estabilidad de la expresión (M) de cada gen de referencia candidato evaluado (fig. 19a). Un valor de M bajo indica una expresión muy estable, en las condiciones de ensayo, del gen analizado. Los genes con los valores de M más bajos fueron: *gapdh* y *efl- α* con un valor de 1.10. Los valores de M por arriba de 1.5 indican una alta variabilidad bajo las condiciones probadas, por lo tanto, no podrían utilizarse como genes de referencia.

7.10.2 Análisis de BestKeeper

En la figura 19b, se muestra el índice de estabilidad obtenido con BestKeeper, que al igual que GeNorm, permitió identificar como los genes con mayor estabilidad a *gapdh* (1.38) y *ef1- α* (1.70), por lo que pueden considerarse adecuados para la normalización de los datos.

7.10.3 Análisis NormFinder

Los resultados encontrados con este programa mostraron que el gen con mayor estabilidad bajo las condiciones de ensayo es *tub β* (0.42) ya que presento un valor cercano a cero.

Con base al consenso de los resultados de los tres programas utilizados, se decidió utilizar *gapdh*, *ef1- α* y *tub β* como genes de referencia para realizar los análisis de expresión por qPCR en glándula digestiva de *C. gigas* (fig. 19c).

Así mismo, se analizó la estabilidad de la expresión de cinco genes de referencia (*tub β* , *ef1- α* , *act*, *gapdh* y *28s ARNr*) como se menciona en el apartado 6.10, midiendo sus niveles de expresión en muestras de ADNc de hemocitos de ostiones alimentados con una dieta mixta de *I. galbana* (2×10^6 cel mL⁻¹) + *G. catenatum* (6×10^3 cel mL⁻¹), comparando con un control no tóxico de *I. galbana* (2×10^6 cel mL⁻¹) y un control tóxico dieta con solo *G. catenatum* (6×10^3 cel mL⁻¹). Para cada muestra, se calculó la estabilidad de la expresión de cada gen utilizando la media geométrica de los valores Ct. Cabe aclarar que los valores de ct para *act* y *tub β* mostraron inconsistencias por lo que se descartaron para este análisis. El

análisis se realizó directamente en la página web: RefFinder (<http://www.leonxie.com/referencegene.php?type=reference#>) utilizando los programas GeNorm, NormFinder y BestKeeper. En la tabla VIII, se muestran los valores de estabilidad para los 3 genes analizados con cada programa utilizado. Genorm y NormFinder coincidieron en que *28s ARNr* y *gapdh* fueron los 2 genes más estables y BestKeeper mostró al gen *ef1- α* como el más estable, entonces, se tomó la decisión de incluir los 3 genes como endógenos para realizar los análisis de expresión en hemocitos de *C. gigas*.

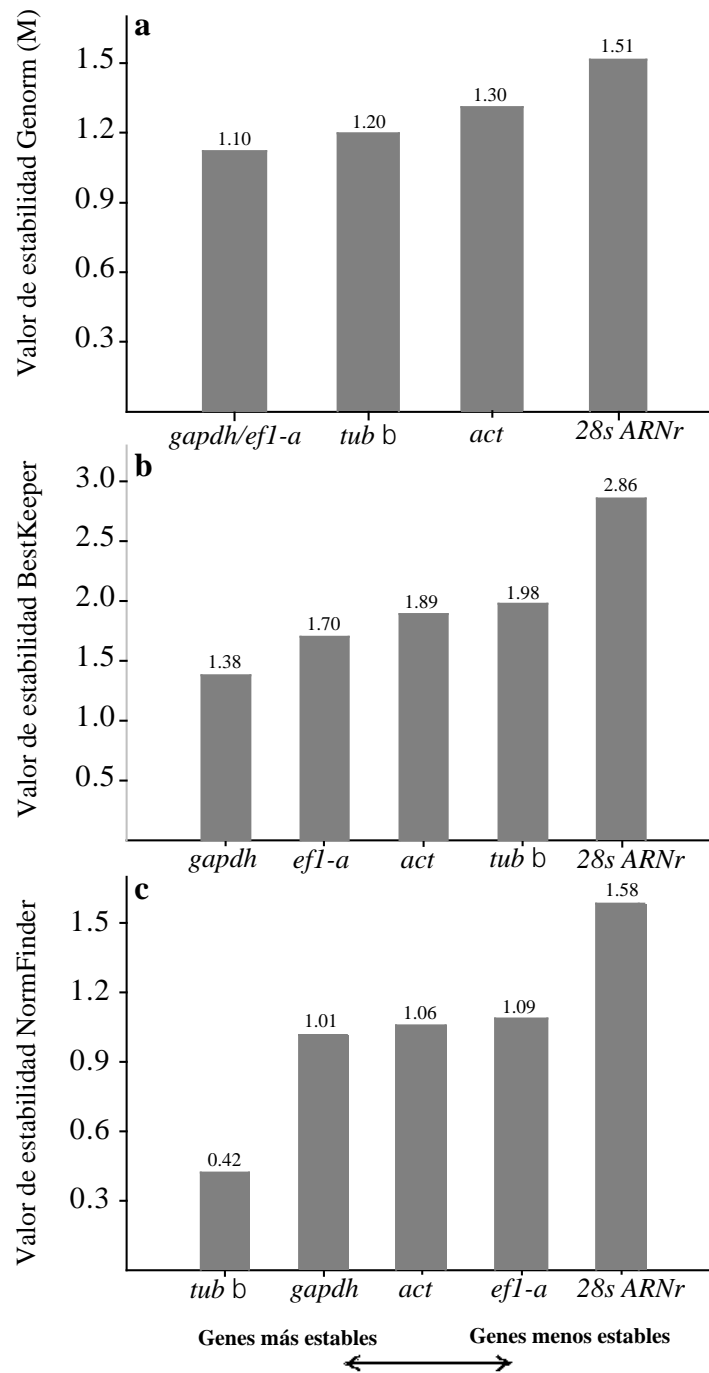


Figura 19. Promedio de la estabilidad de la expresión de genes candidatos de referencia en glándula digestiva de juveniles de 50 ± 10 mm de *C. gigas*, calculados con los softwares GeNorm (a), BestKeeper (b) y NormFinder (c) ($n = 18$).

Tabla VIII. Análisis de estabilidad de los genes de referencia en hemocitos de juveniles de 50 ± 10 mm de *C. gigas*.

Gen	Valor de estabilidad		
	<u>GeNorm (M)</u>	<u>NormFinder</u>	<u>BestKeeper</u>
<i>28s ARNr</i>	1.40	1.11	2.04
<i>Gapdh</i>	1.40	1.63	1.96
<i>ef1-α</i>	2.23	1.84	1.57

7.11 Análisis cuantitativo de genes de regulación del ciclo celular, citoesqueleto, inflamación, apoptosis y detoxificación en glándula digestiva de juveniles de 50 ± 10 mm de *C. gigas*.

7.11.1 Genes de regulación del ciclo celular

Para determinar el efecto de la exposición de *C. gigas* al dinoflagelado tóxico a nivel de glándula digestiva, se determinaron los cambios a nivel de transcripción de genes que participan en puntos clave de control y reparación del daño dentro de la progresión del ciclo celular, genes relacionados con procesos de inflamación, apoptosis y citoesqueleto, para de esta forma analizar y entender la posible correlación sobre un efecto genotóxico de las PST producidas por *G. catenatum*.

En este estudio, la exposición modificó la cantidad de transcritos en los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* (2×10^6 cel mL⁻¹) + *G. catenatum* (6×10^3 cel mL⁻¹), y el control tóxico (sólo *G. catenatum*). Como puede observarse en la figura 20, en

todos los genes analizados los cambios a nivel de síntesis de mensajeros se presentan a partir del día 3 de exposición. Para el gen *p21*, el mayor nivel de transcripción se encontró en el control toxico (6×10^3 cel mL⁻¹ de *G. catenatum*), donde el máximo se registró al día 7 con 13 veces arriba del nivel basal (fig. 20a).

Por otro lado, el gen *p53* se observó completamente reprimido en los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* (2×10^6 cel mL⁻¹) + *G. catenatum* (6×10^3 cel mL⁻¹), así como en el control tóxico (6×10^3 cel mL⁻¹ de *G. catenatum*) a las 24 h de exposición; sin embargo, se encontraron niveles máximos de 4 veces por arriba del nivel basal en ambos tratamientos a los 3 días de exposición (fig. 20b).

El nivel de transcritos de *cafp55*, se incrementó significativamente en los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* (2×10^6 cel mL⁻¹) + *G. catenatum* (6×10^3 cel mL⁻¹) a partir de los 3 días de exposición con 4 veces arriba del nivel basal y en los ostiones alimentados con el control tóxico con 3 veces (fig. 20c).

La expresión de *ef2* solo presentó un ligero aumento con la dieta mixta y en el control tóxico a los 3 días de exposición, sin embargo, a los 7 días se reprimió 0.5 veces por debajo del nivel basal en ambas condiciones (fig. 20d).

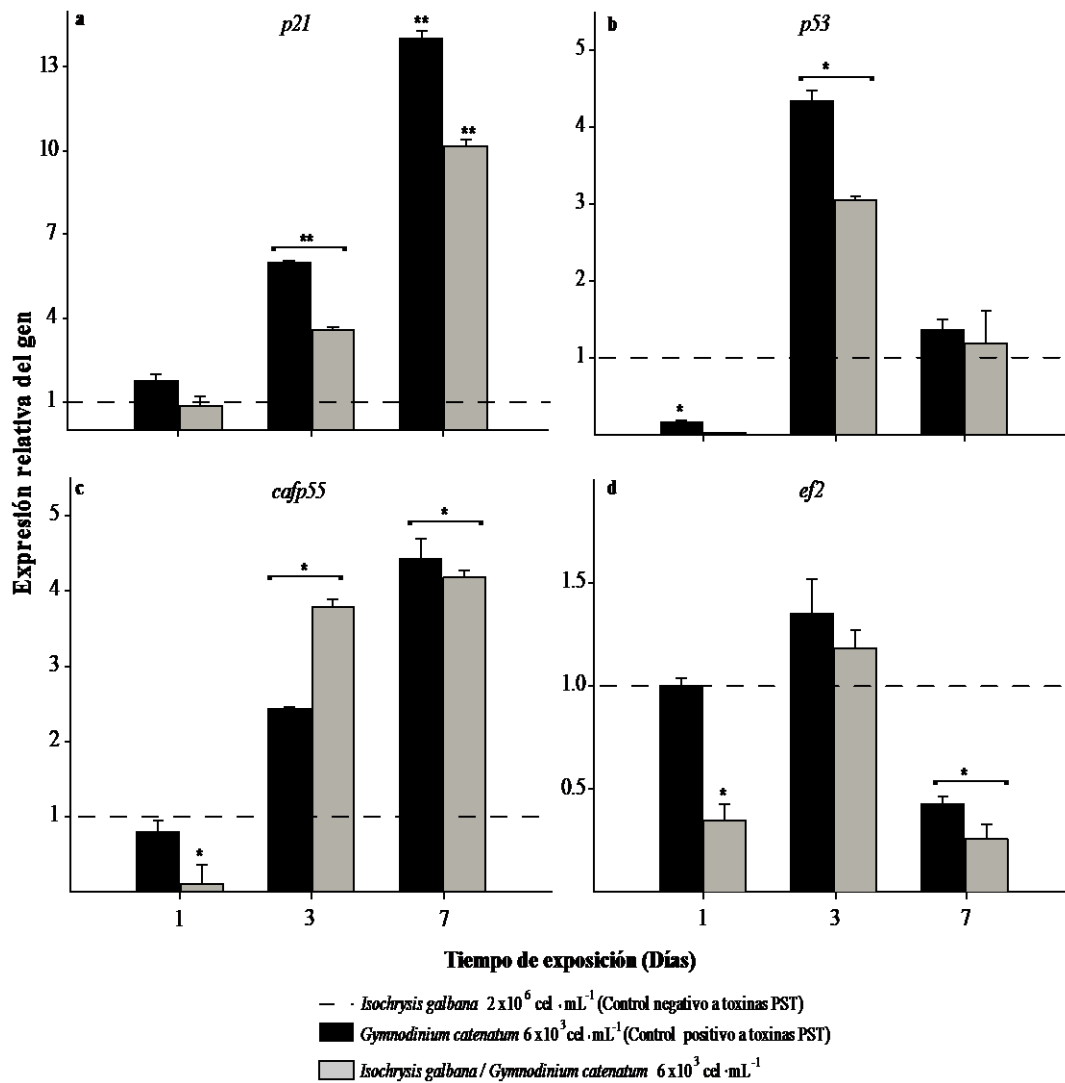


Figura 20. Análisis de la expresión relativa (qPCR) de los genes de *C. gigas* relacionados con la regulación del ciclo celular en glándula digestiva, bajo exposición subcrónica a *G. catenatum*. Paneles: a) Proteína p21 reguladora del ciclo celular (*p21*); b) Proteína p53 (*p53*); c) Factor 1 de ensamblaje de cromatina subunidad p55 (*cafp55*); d) Factor de elongación 2 (*ef2*). Los valores de expresión se muestran como expresión normalizada con genes de referencia *gapdh*, *ef1-α* y *tub β* y relativo al calibrador (línea de puntos). Las barras representan la desviación estándar (SD) mientras que el asterisco indica diferencias significativas entre los tratamientos y el control negativo (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$; HSD de Fisher).

7.11.2 Genes involucrados en procesos inflamatorios y el citoesqueleto

El nivel de transcritos del gen de la *caspl*, no sufrió modificaciones durante las primeras 24 h de exposición al dinoflagelado, sin embargo, se observó una sobreexpresión significativa después de los 3 días, permaneció así hasta los 7, tanto con la dieta mixta (6×10^3 cel mL⁻¹ de *G. catenatum*) y el control tóxico. En este último, se registraron los valores máximos de hasta 13 veces por arriba del nivel basal a los 7 días (fig. 21a). En el control tóxico, el nivel de transcritos del gen de la *act* se sobreexpresó durante los 3 primeros días de exposición y se reprimió hasta alcanzar el nivel basal a los 7 días, mientras que el tratamiento con 6×10^3 cel mL⁻¹ presentó un ligero incremento a los 3 días de exposición, pero se observó casi completamente reprimido a los 7 días (fig. 21b).

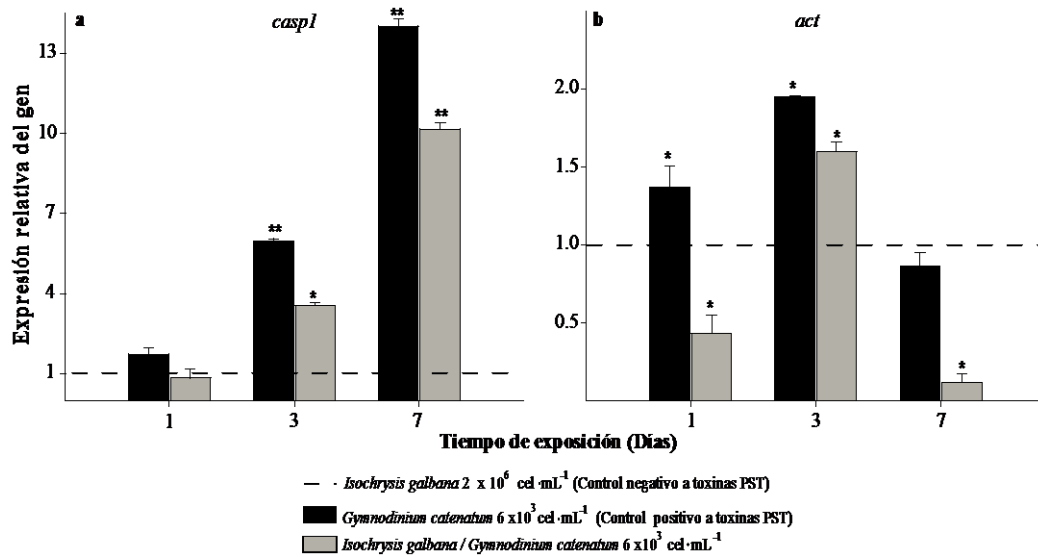


Figura 21. Análisis de la expresión relativa (qPCR) de los genes de *C. gigas* relacionados con la regulación del ciclo celular y citoesqueleto en glándula digestiva, bajo exposición subcrónica a *G. catenatum*. Paneles: **a)** Actina (*act*), **b)** Caspasa 1 (*caspl*). Los valores de expresión se muestran como expresión normalizada con los genes de referencia *gapdh*, *efl-α* y *tub β* (genes de referencia) y relativo al calibrador (línea de puntos). Las barras representan la desviación estándar (SD) y los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos y el control negativo (* $p < 0.05$, ** $p = 0.001$; HSD de Fisher).

7.12 Análisis cuantitativo de genes relacionados con la respuesta inmune en hemocitos de juveniles de 50 ± 10 mm de *C. gigas*.

En este trabajo, se encontró que en los hemocitos de ostiones expuestos a *G. catenatum*, los cuatro genes relacionados al sistema inmune (*lgbp*, *if44*, *cvt* y *hsp70*) fueron regulados, observándose que la mayor sobreexpresión se presentó en los ostiones alimentados con el control tóxico (6×10^3 cel mL^{-1} de *G. catenatum*) en el primer día de exposición.

El nivel de expresión del gen *lgbp* se incrementó en los ostiones alimentados con el control tóxico, 12 veces por encima del nivel basal en el primer día de exposición, disminuyendo a los 3 días, sin embargo, aún se mantuvo sobreexpresado quedando arriba del nivel basal. En los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* (2×10^6 cel mL^{-1}) + *G. catenatum* (6×10^3 cel mL^{-1}) la transcripción de *lgbp* se incrementó desde el día uno 1 hasta el día 7, alcanzando un valor máximo de 9 veces por arriba del nivel basal (fig. 22a).

El gen *if44* se sobreexpresó en los ostiones alimentados tanto con la dieta mixta como con el control tóxico, mostrando valores de 8 y 13 veces respectivamente por arriba del nivel basal para el día uno, posteriormente disminuyó significativamente ($p < 0.05$) en ambas condiciones a los 3 d de exposición (fig. 22b).

El gen *cvt* se sobreexpresó en los primeros 3 días de exposición al dinoflagelado, con un valor máximo en los ostiones alimentados con el control tóxico con 7 veces arriba del nivel

basal para el día 1, sin embargo, después del día 3 se reprimió significativamente ($p < 0.05$) por abajo del nivel basal después de 7 días de exposición en dicho tratamiento. En los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* (2×10^6 cel mL⁻¹) + *G. catenatum* (6×10^3 cel mL⁻¹), sigue un comportamiento igual, con una mayor sobreexpresión para el día 1 con 3 veces por arriba del nivel basal y con una disminución significativa ($p < 0.05$) hasta casi reprimirse en el día 7 de exposición (fig. 22c).

El nivel de transcritos del gen *hsp70* incrementó significativamente ($p < 0.05$) durante el primer día de exposición, con valores de 35 veces por arriba del nivel basal en los ostiones alimentados con el control tóxico y 28 veces en la dieta mixta de *I. galbana* (2×10^6 cel mL⁻¹) + *G. catenatum* (6×10^3 cel mL⁻¹); después del día 3 se observó una disminución en el nivel de transcripción en ambas condiciones, pero aún se mantiene sobreexpresado por arriba del nivel basal con valores de 8 veces hasta concluir el experimento (al día 7) (fig. 22d).

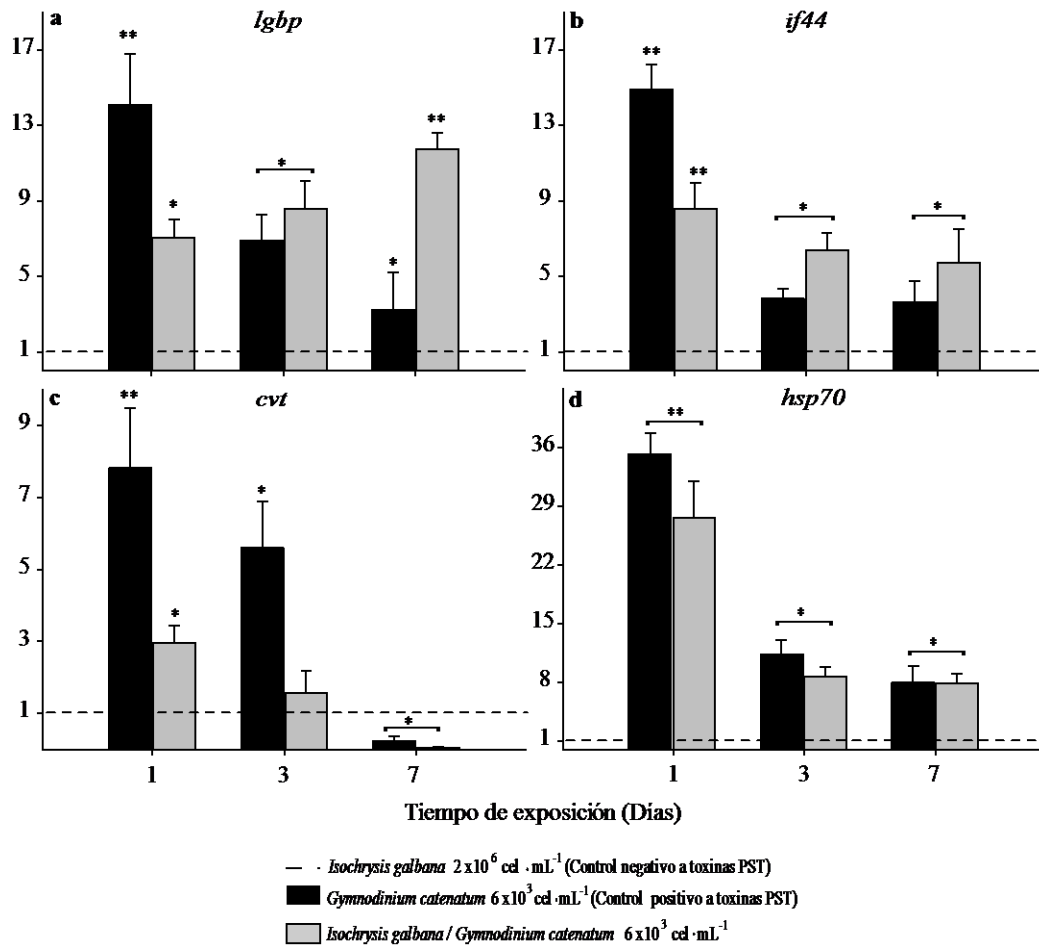


Figura 22. Análisis de la expresión relativa (qPCR) de los genes de *C. gigas* de genes relacionados con la respuesta inmune en hemocitos de *C. gigas*, bajo exposición subcrónica a *G. catenatum*. Paneles: **a**) Proteína de unión a LPS y β -1,3glucano (*lgbp*); **b**) Proteína inducida por interferón 44 (*if44*); **c**) Cavortina (*cvt*); **d**) Proteína de shock térmico HSP70 (*hsp70*). Los valores de expresión se muestran como expresión normalizada con los genes de referencia *gapdh*, *28s ARNr* y *ef1- α* y relativo al calibrador (línea de puntos). Las barras representan la desviación estándar (SD) mientras que los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos y el control negativo (* $p < 0.05$, ** $p = 0.001$; HSD de Fisher).

7.13 Análisis histológico en juveniles de *C. gigas* de 3 ± 1 mm

7.13.1 Glándula digestiva

Las lesiones y los cambios estructurales que se observaron en la glándula digestiva de *C. gigas* de 3 ± 1 mm de talla alimentados con las dietas mixtas y el control tóxico durante los 14 días de exposición fueron aplanamiento celular, inflamación, ruptura, exfoliación, y metaplasia. Los ostiones alimentados con el control no tóxico (*I. galbana*) mostraron en las células de absorción de los túbulos de la glándula digestiva una altura normal, los epitelios no se observaron aplanados y el lumen de los túbulos de la glándula presento una forma normal estrellada (Fig. 23a). En cambio en los ostiones alimentados con la dieta mixta de 3×10^3 cel mL⁻¹ de *G. catenatum*, en las células de absorción del epitelio de forma cuboidal se observó una altura intermedia y desprendimiento de algunas células dentro del lumen de los túbulos (Fig. 23c). Los ostiones alimentados con el control tóxico (Fig. 23b) y la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* (30×10^3 cel mL⁻¹) presentaron una disminución considerable en la altura de las células de absorción de los túbulos de la glándula digestiva, con una exfoliación aguda del epitelio digestivo principalmente en la dieta mixta y migración de las células de absorción al lumen de la glándula (Fig. 23d), como es indicado en la figura con flechas negras. Además, en los organismos alimentados con el control tóxico se puede observar metaplasia del epitelio de la glándula digestiva que muestra una apariencia cuboidal baja de las células epiteliales acompañada por una marcada dilatación de la luz de la glándula digestiva y ruptura del epitelio (como se indican en la figura con flechas en color azul). Sin embargo, los ostiones alimentados con la dieta

mixta con 30×10^3 cel mL⁻¹ de *G. catenatum* fueron los más severamente afectados, presentando apariencia escamosa del epitelio tubular y metaplasia (flechas en color azul).

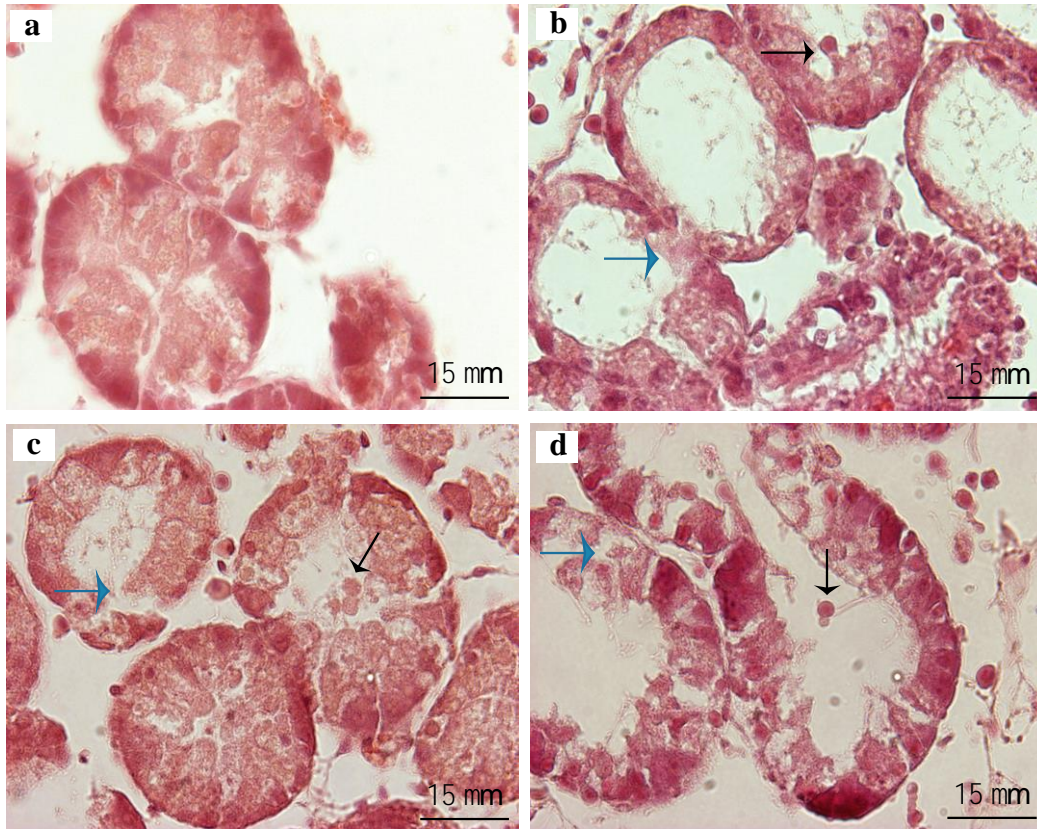


Figura 23. Corte transversal de los túbulos de la glándula digestiva de juveniles de *C. gigas* de 3 ± 1 mm, expuesto a *G. catenatum* (técnica de tinción, hematoxilina-eosina). Paneles: **a)** organismo control alimentados con *I. galbana* (0.75×10^6 cel mL⁻¹); **b)** control toxico *G. catenatum* (3×10^3 cel mL⁻¹); **c)** dieta mixta *I. galbana* (0.75×10^6 cel mL⁻¹) + *G. catenatum* (3×10^3 cel mL⁻¹); **d)** dieta mixta *I. galbana* (0.75×10^6 cel mL⁻¹) + *G. catenatum* (30×10^3 cel mL⁻¹) (Microscopio Olympus BX41, 100 X).

7.13.2 Músculo, Manto y Branquia

Los organismos expuestos al dinoflagelado tóxico también presentaron daños en otros tejidos. En la figura 24 se muestran las alteraciones en: músculo, branquia y manto en los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* (0.75×10^6 cel mL⁻¹) + *G.*

catenatum (30×10^3 cel mL^{-1}) comparado con los tejidos del control no tóxico. Es importante aclarar que no se presentan las alteraciones con la dieta mixta con *G. catenatum* (3×10^3 cel mL^{-1}) ni con el control tóxico porque los daños son similares, pero con un efecto mayor en la dieta mixta con la mayor concentración de *G. catenatum*. En la fig. 24a puede observarse un corte transversal del músculo estriado de organismos alimentados con el control no tóxico, en la que se observan las características histológicas propias de un tejido normal. En cambio, en el músculo estriado de los ostiones expuestos a las diferentes condiciones con *G. catenatum* (fig. 24b) se observó aparentemente distrofia muscular caracterizada por la separación de fibras musculares (ocasionada aparentemente por la disminución en volumen), originando espacios intersticiales entre las células musculares indicadas con las flechas en color negro; también se indica edema en algunas células musculares (flechas en color azul). En la fig. 24c se muestran filamentos branquiales de ostiones alimentados con el control no tóxico, mientras que en la fig. 24d, se muestran los mismos de ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* (0.75×10^6 cel mL^{-1}) + *G. catenatum* (30×10^3 cel mL^{-1}). Estas estructuras también sufrieron un daño por la exposición a las células tóxicas, se observa la pérdida de cilios branquiales e inflamación del tejido debido a exfoliación y desorganización de las células epiteliales de los arcos branquiales. Además, a través de inspección macroscópica y microscópica, se detectaron lesiones en el manto (melanosis, caracterizada porque las células toman una coloración café), principalmente en los ostiones alimentados con el control tóxico y con la dieta mixta de *I. galbana* (0.75×10^6 cel mL^{-1}) + *G. catenatum* (30×10^3 cel mL^{-1}), en la imagen se señalan con las flechas en color negro la apariencia microscópica (fig. 24f).

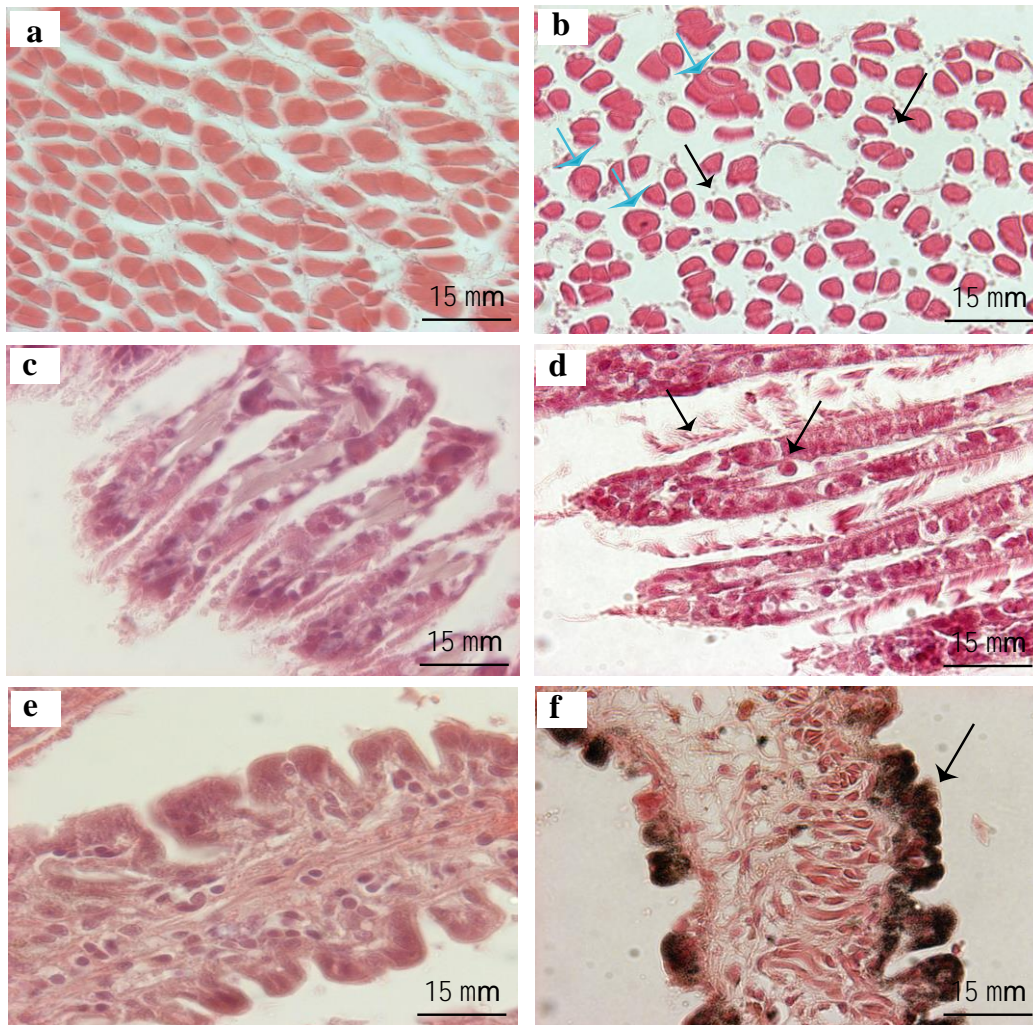


Figura 24. Cortes de diferentes tejidos en juveniles de *C. gigas* de 3 ± 1 mm, expuesto a *G. catenatum* teñidas con hematoxilina-eosina. Músculo estriado: **a)** organismo control alimentados con *I. galbana* (0.75×10^6 cel mL^{-1}); **(b)** dieta mixta *I. galbana* + *G. catenatum* (30×10^3 cel mL^{-1}). Branquia **c)** organismo control alimentados con *I. galbana* (0.75×10^6 cel mL^{-1}); **(d)** dieta mixta *I. galbana* + *G. catenatum* (30×10^3 cel mL^{-1}). Manto **e)** organismo control alimentados con *I. galbana* (0.75×10^6 cel mL^{-1}); **(f)** dieta mixta *I. galbana* + *G. catenatum* (30×10^3 cel mL^{-1}) (Microscopio Olympus BX41, a 100 X).

7.14 Análisis histológico en juveniles de *C. gigas* de 50 ± 10 mm

7.14.1 Glándula digestiva y otros tejidos

En la figura 25 a, se muestra la glándula digestiva de los organismos alimentados solo con *I. galbana* (control no tóxico), en las que no hay daño aparente. Se puede apreciar el estado saludable de la glándula con su forma estrellada y los cilios de la cara interna del epitelio intactos. En figura 25b y c se muestra el daño promovido en la glándula por la ingestión de *G. catenatum* en ostiones de 50 ± 10 mm de talla expuestos a la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* 6×10^3 cel mL⁻¹. El daño tisular observado fue muy similar al daño encontrado en los organismos alimentados solo con el dinoflagelado (control tóxico) por lo tanto, solo se presentan las imágenes correspondientes a la dieta mixta. En ambas condiciones, los ostiones presentaron una disminución considerable en la altura de las células de absorción de los túbulos de la glándula digestiva (como se indica en la figura con flechas en color negro), con exfoliación aguda del epitelio digestivo y migración de las células de absorción al lumen de la glándula (como se indica en la figura con flechas en color rosa). Además, se observó infiltración de hemocitos, pérdida de los cilios del epitelio de los túbulos digestivos que rodean el lumen (cara interna) y un aumento en el número de hemocitos en el tejido conectivo que rodea los túbulos.

Otro tejido que presento alteraciones tisulares en organismos expuestos al dinoflagelado tóxico fue el intestino; es importante señalar que el epitelio intestinal consiste de una sola capa de células epiteliales ciliadas y no ciliadas expuesto sobre una lámina basal, con células caliciformes intercaladas entre ellas. En la fig. 25d se muestran el epitelio intestinal

de los organismos alimentados con el control no tóxico, en el que no se observa daño: los cilios del interior del lumen del intestino se presentan intactos y no se observan hemocitos en diapédesis. En las figuras 25e y f, se muestra el daño en los ostiones causado por la ingestión de *G. catenatum*. Se identificaron las siguientes alteraciones: inflamación del tejido, diapédesis o infiltración de hemocitos (atraviesan el epitelio intestinal hasta el lumen), además, pérdida ciliar, desestabilización del tejido (espacios vacíos, por donde atravesaron los hemocitos) y desorganización de las células epiteliales.

En la figura 25g, se muestra la organización normal de las branquias de los organismos alimentados con el control no tóxico, mientras que en la fig. 25h, se presentan cortes del intestino de ostiones alimentados con *G. catenatum* (dieta mixta y el control tóxico). En estos cortes se pudo identificar desorganización del epitelio e infiltración de hemocitos a nivel del tejido conjuntivo, además de alteraciones en los filamentos branquiales, fusión y pérdida de la ciliatura.

El manto de los ostiones expuestos al dinoflagelado también presentaron daños a nivel de tejido, principalmente melanosis. En la figura 25i, se muestra una fotografía del manto de organismos expuestos a condiciones normales en el que se observan las características histológicas propias de un tejido normal, mientras que en la fig 25j, se ejemplifica el daño provocado en los ostiones expuestos al dinoflagelado (dieta mixta y contro tóxico), en estos cortes se puede observarse melanosis (flechas en color negro).

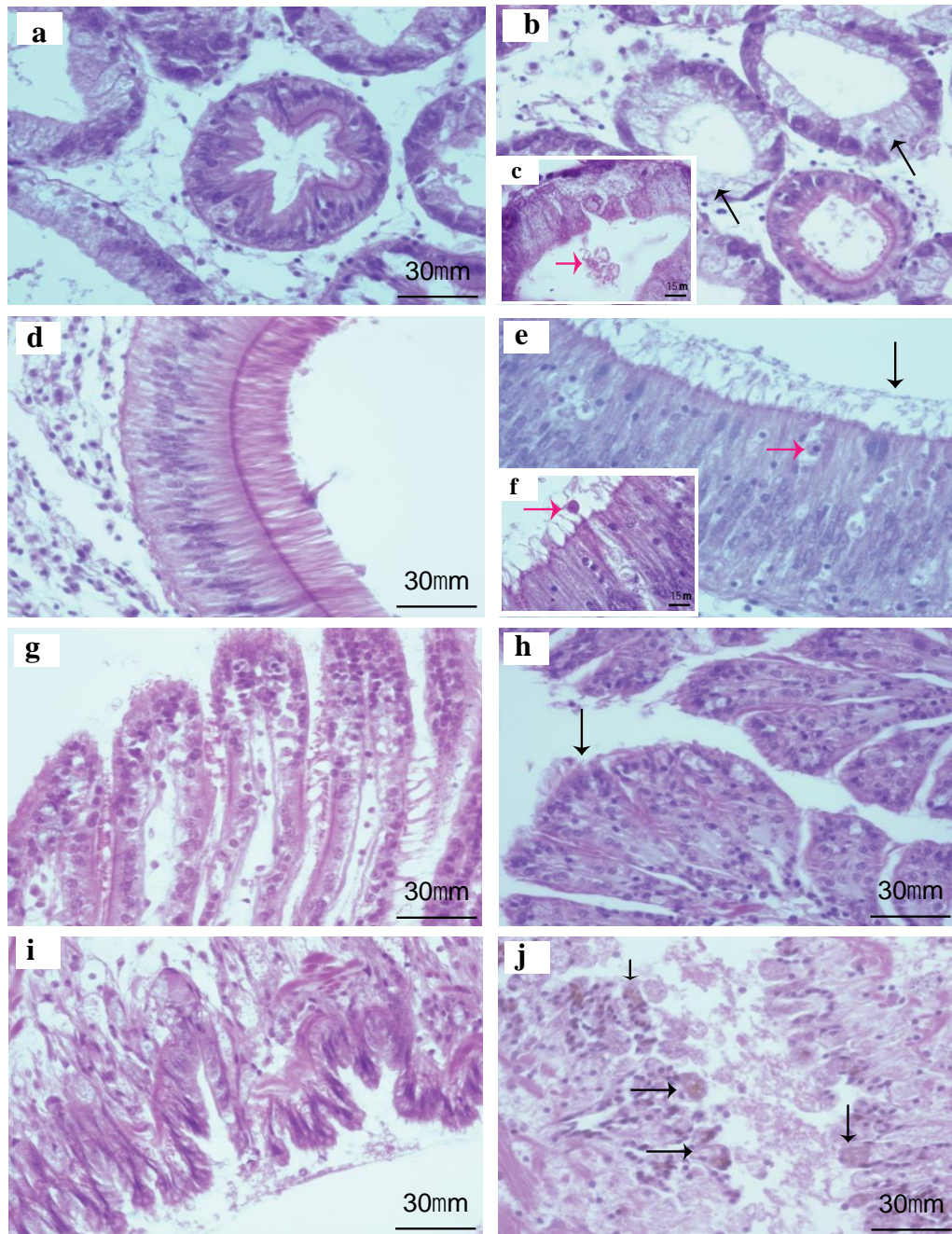


Figura 25. Histopatología de varios tejidos de *C. gigas* de 50 ± 10 mm de talla, teñidas con hematoxilina-eosina. Glándula digestiva: (a) organismo control alimentados con *I. galbana* (2×10^6 cel mL⁻¹), (b) y (c) organismo alimentados con *I. galbana* 2×10^6 cel mL⁻¹ y *G. catenatum* 6×10^3 cel mL⁻¹; Intestino: (d) organismo control alimentados con *I. galbana* (2×10^6 cel mL⁻¹), (e) y (f) organismo alimentados con *I. galbana* 2×10^6 cel mL⁻¹ y *G. catenatum* 6×10^3 cel mL⁻¹; Branquia (g) organismo control alimentados con *I. galbana* (2×10^6 cel mL⁻¹) y (h) organismo alimentados con *I. galbana* 2×10^6 cel mL⁻¹ y *G. catenatum* 6×10^3 cel mL⁻¹; Manto (i) organismo control alimentados con *I. galbana* (2×10^6 cel mL⁻¹) y (j) organismo alimentados con *I. galbana* 2×10^6 cel mL⁻¹ y *G. catenatum* 6×10^3 cel mL⁻¹. Microscopio olympus BX41, a 40 X y 100 X (c y f).

8. DISCUSIÓN

8.1 Observaciones sobre el comportamiento alimenticio y tasas de aclaramiento en juveniles de *Crassostrea gigas*

Es bien conocido que en moluscos bivalvos las toxinas PST se acumulan en los tejidos a través del proceso de alimentación. Varias investigaciones se han enfocado al estudio del efecto de la ingesta de dinoflagelados productores de estas toxinas, y abarcan un amplio abanico de temáticas, desde el comportamiento alimenticio (Shumway, 1990; Bougrier et al., 1997; Wilsh et al., 1998, Gainey y Shumway, 1990; Hegaret et al., 2007), la cinética de acumulación (Gainey y Shumway, 1990; Laabir et al., 2007), los mecanismos de depuración (Gainey y Shumway, 1990; Guégen et al., 2008) hasta los daños citológicos (Wikfors, 2005). En este estudio, *C. gigas* fue expuesto durante 24 horas (exposición aguda) y por un periodo de 14 días (exposición subcrónica) a diferentes concentraciones de *G. catenatum*, tratando de emular (con sus limitaciones) el escenario al que se enfrentan los organismos en el ambiente marino durante su primer contacto en un evento de marea roja o FAN, dando seguimiento a los cambios que le suceden cuando está expuesto durante un tiempo prolongado a dichos eventos.

En este sentido, cuando *C. gigas* está expuesto a células tóxicas suceden cambios visibles en el comportamiento alimenticio tanto en juveniles de 3 ± 1 mm como en aquellos de 50 ± 10 mm, en tratamientos en dieta mixta y solo el dinoflagelado como son: cierre inmediato de valvas, producción de pseudoheces y moco, retracción del manto y disminución de la tasa de aclaramiento. Esta respuesta en comportamiento puede considerarse como una

manifestación de cambios fisiológicos inducidos por este dinoflagelado. Así mismo, los cambios en comportamiento alimenticio antes mencionados también han sido registrados en otras especies de moluscos bivalvos expuestos a dinoflagelados tóxicos (Bardouil et al., 1996; Bougrier et al., 1997; Blanco et al., 1997; Wilsh et al., 1998; Lassus et al., 2000; Laabir et al., 2007), por lo que los resultados obtenidos en este trabajo corroboran esta información.

Por su parte Shumway (1991), indica que cuando los organismos son expuestos a una concentración de partículas por arriba de su límite de saturación, son capaces de controlar la cantidad de material ingerido haciendo uso de diferentes estrategias: a) reduciendo el tiempo de bombeo (comportamiento de alimentación discontinua), b) reduciendo sus tasas de aclaramiento, y c) incrementando el material rechazado en forma de pseudoheces. Este comportamiento concuerda con el trabajo reportado por Siu-Chung et al. (2001), en el que *Chlamys nobilis* y *Ruditapes philippinarum* al ser alimentados con una mezcla de *Alexandrium tamarense* (30-40 μm) y *Thalassiosira pseudonana* (5-6 μm) presentaron tasas de aclaramiento similares; las almejas no fueron capaces de diferenciar entre las dos especies de microalgas. Por su parte, Laabir et al. (2007) reportaron para *C. gigas* tasas de aclaramiento de *A. catenella* de 0.34 ($1 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$) y de 0.26 para *A. minutum* ($2 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$) en un periodo de 24 horas; estos datos son similares a los encontrados en este trabajo con *G. catenatum* a $3 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$. Además, Bardouil et al. (1996) demostraron que la inclusión de un 10 % del dinoflagelado tóxico *A. tamarense* en una dieta produce una reducción del 20 % en la tasa de aclaramiento de *C. gigas*.

En este trabajo, observamos una gran cantidad de microalgas no filtradas a las 24 horas post-exposición con las dieta mixtas de *I. galbana* + 3×10^3 y 30×10^3 cel mL⁻¹ de *G. catenatum* (T3), lo que indica que la tasa de aclaramiento disminuyó significativamente ($p < 0.05$) al incrementar la concentración del dinoflagelado en la dieta. Aunque el tamaño de *G. catenatum* (65-43 μm) es entre 8-10 veces mayor que el de *I. galbana* (4-5 μm), el ostión fue capaz de ingerir las dos microalgas ya que al realizar los conteos celulares a partir del agua de las unidades experimentales se observó una disminución en el número de las dos microalgas, esto también se corroboró al incluir la dieta con sólo el dinoflagelado (control tóxico). El cierre parcial de valvas y la producción de pseudoheces son un indicativo de que *C. gigas* reguló la ingestión de partículas. Con esto se puede decir que en una mezcla de estas microalgas, el ostión no selecciona las células con base en su tamaño, sin embargo, se observó una preferencia por ingerir *I. galbana*. Este comportamiento ha sido observado en otros estudios, en los que se menciona que los bivalvos hacen una selección preingestiva que no necesariamente depende del tamaño celular, sino de otros factores como la forma de la célula, su composición bioquímica o la secreción de algún metabolito (Bougrier, 2003). De igual forma, se puede pensar que *C. gigas* no es capaz de diferenciar el dinoflagelado tóxico de una microalga no tóxica, ya que al realizar el análisis microscópico de las pseudoheces se observaron ambas ó también a *I. galbana* embebida en el mucus, sin embargo, cabe aclarar que en las muestras observadas dominó el dinoflagelado.

En general, el tratamiento con la concentración más alta del dinoflagelado (30×10^3 cel mL⁻¹)¹⁾ mostró un mayor efecto en el comportamiento alimenticio de *C. gigas*, revelando que un periodo de 24 horas (exposición aguda) no es suficiente para que los organismos se

aclimaten a la condición. En cambio, después del periodo inicial y con concentraciones menores del dinoflagelado (3×10^3 cel mL⁻¹), *C. gigas* demostró capacidad para aclimatarse a la dieta tóxica, ya que las tasas de aclaramiento fueron mayores y la formación de pseudoheces no perduró hasta finalizar el experimento. Este mecanismo de protección a través de la regulación en la tasa de aclaramiento o remoción de las células tóxicas, puede permitir el aprovechamiento de la energía que los dinoflagelados proporcionan como fuente de alimento además, de evitar el daño por la ingesta de toxinas. Sin embargo, aun no es claro si el efecto negativo sobre la conducta de alimentación fue causado por la presencia de la PST, otros compuestos celulares o debido al tamaño de las células del dinoflagelado considerando el tamaño de *I. galbana* usado como control.

8.2 Efecto de *G. catenatum* en la expresión de genes de estrés, defensa antioxidante y detoxificación celular en *C. gigas* de 3 ± 1 mm

Las bases moleculares de la respuesta de los organismos a las toxinas de microalgas y dinoflagelados (en especial, de dinoflagelados productores de PST) son poco conocidas en moluscos bivalvos. En este trabajo se seleccionaron cinco genes con diferentes funciones, de los que uno o todos podría resultar ser una herramienta sensible para detectar cambios cuando los ostiones estén expuestos a los dinoflagelados tóxicos.

En términos generales, cuando *C. gigas* fue expuesto a *G. catenatum*, los cambios observados fueron dependientes tanto del tiempo de exposición como de la dosis utilizada (número de células proporcionadas del dinoflagelado), particularmente durante la exposición subcrónica. Aunque en los ostiones alimentados con *I. galbana* (control no

tóxico) los niveles basales de expresión exhibieron cierta variabilidad, estos cambios fueron mínimos durante el transcurso del bioensayo. Sin embargo, los cambios observados en el nivel de expresión relativa en los organismos tratados (tiempo dosis-dependiente), sugieren una relación directa con la ingestión del dinoflagelado tóxico. Por lo tanto, la magnitud de dichos cambios podría tener su base en la susceptibilidad particular del gen (o genes) a cualquier componente del dinoflagelado y no solo a la presencia de las toxinas PST.

En los mecanismos de señalización para el reconocimiento de agentes extraños, en primer lugar sucede la interacción con receptores celulares para iniciar la respuesta de defensa, realmente no requiere la participación de los productos obtenidos mediante la activación transcripcional. Las primeras respuestas asociadas a inductor-receptor son: la alteración en el flujo de iones a través de la membrana, la fosforilación y desfosforilación de proteínas específicas de la célula, y la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO). Este último proceso sucede principalmente durante los primeros 2-5 minutos de la respuesta y se conoce como estrés oxidativo (Manduzio et al., 2005). Las ERO actúan como mensajeros secundarios, activando la transcripción de genes específicos, probablemente implicados en los procesos de detoxificación y protección al daño celular generado por el estrés oxidativo (Manduzio et al., 2005). En este estudio se observó que la respuesta de defensa inmediata del ostión (bioensayo de exposición aguda) se presentó alterando el nivel de expresión de los diferentes genes involucrados en respuesta a estrés, antioxidante, detoxificación y sistema inmune estudiados. Sin embargo, a lo largo de una exposición subcrónica el monitoreo de dichos genes permitieron observar su comportamiento a mediano plazo, y como éste afecta a los organismos.

Las enzimas antioxidantes han sido propuestas como marcadores ambientales para evaluar el impacto que genera el estrés oxidativo por metales pesados y algunos xenobióticos orgánicos (Halliwell y Gutteridge, 1999; Tomanek, 2011). La enzima superóxido dismutasa (SOD), es un importante componente de la defensa antioxidante en la mayoría de las células expuestas a oxígeno. Esta enzima protege a la célula de las reacciones dañinas provocadas por el radical superóxido ($\bullet\text{O}^{-2}$), convirtiéndolos a una forma menos peligrosa al dismutar al radical superóxido a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Buggr et al., 2007). Durante las primeras 6 horas, el nivel de transcripción del gen que codifica la enzima SOD (*sod-cu/zn*) no fue alterado con 3×10^3 cel mL^{-1} , sin embargo, el incremento fue observado después de 12 h de exposición. Este resultado podría indicar que el número de células de *G. catenatum* (3×10^3 cel mL^{-1}) causa una efecto positivo neto sobre la expresión de *sod-cu/zn*, a pesar de que se da una adaptación de la expresión (aumento) que equilibra las condiciones para permitir la restauración del estado de homeostasis en los ostiones expuestos. Así mismo, se encontró que después de un breve período de exposición a 30×10^3 cel mL^{-1} de *G. catenatum*, la transcripción de *sod-cu/zn* fue reprimida; los efectos nocivos fueron evidentes dado que el efecto de represión bajo esas condiciones fue continuo (desde el inicio del bioensayo y hasta las 24 h), recuperándose lentamente. No obstante lo anterior, en una exposición subcrónica se observó un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en el nivel de expresión del gen en los organismos alimentados con la dieta mixta (30×10^3 cel mL^{-1}) y en los organismos alimentados con el control positivo, comparado con los alimentados con la dieta mixta de 3×10^3 cel mL^{-1} . Al mismo tiempo, se destaca que el nivel de expresión de *sod-cu/zn* en los ostiones alimentados con el control tóxico, fue mayor, independientemente del tiempo de exposición, presentando un punto máximo a los 7 días

de exposición. La diferencia entre estas dos condiciones experimentales es la presencia de *I. galbana* en la dieta, lo que sugiere que la presencia de una microalga no tóxica mitiga de alguna manera el daño en los ostiones, al disminuir la magnitud del impacto. El gen que codifica para *sod-cu/zn* está involucrado en la respuesta celular a muchos estresores ambientales y fisiológicos, por tanto ha sido ampliamente estudiado en respuesta al estrés oxidativo en moluscos bivalvos; en *C. gigas* se ha reportado principalmente después de la exposición a metales pesados (Jenny et al., 2002; Tomanek, 2011) termal (Meistertzheim et al., 2007) mortalidad de verano (Huvet et. al, 2004) exposición a plaguicidas (Boutet et al., 2004; Tanguy et al. 2005; Colin et al. 2010), exposición al dinoflagelado tóxico *P. lima* (Romero-Geraldo y Hernández-Saavedra, 2012) y exposición a brevetoxinas (Mello et al, 2013) donde encontraron que el nivel de expresión de dicho gen aumentó después del reto a estas condiciones de estrés. Como se mencionó anteriormente este gen codifica para la enzima SOD, capaz de disminuir los efectos dañinos de los EROS, y por tanto es considerada como una de las enzimas antioxidantes primarias. Existe una fuerte correlación entre ficotoxinas y el daño oxidativo (Romero-Geraldo y Hernández-Saavedra, 2012; Estrada et al., 2007). Manduzio et al. (2005) señalan que la represión de la *sod-cu/zn* puede indicar una pérdida en la capacidad de protección de la célula contra el radical superóxido, además, estudios recientes demostraron un aumento en la producción de EROS en *C. gigas* expuesto a *A. minutum* productor de PST (Haberkorn et al., 2010a, b).

De esta manera, la sobreexpresión del gen *sod-cu/zn* en los ostiones tras la alimentación con *G. catenatum* es indicativa de la eliminación de ERO, así como de su papel como molécula antioxidante; esta es una estrategia para compensar el daño a nivel celular, aumentando la abundancia de transcritos, lo que podría incrementar la resistencia de los

organismos. Es importante señalar que esta es la primera vez que se reporta un incremento del nivel de expresión de un gen que codifica una enzima antioxidante, en respuesta a la exposición de células completas de *G. catenatum* en *C. gigas*.

La glutatión S transferasa (GST-S) pertenece a una gran superfamilia de enzimas multifuncionales que participan en la detoxificación celular, cataliza la conjugación del glutatión (GSH) con compuestos electrófilicos con una amplia gama de agentes endógenos y xenobióticos, incluyendo sustancias tóxicas y productos del estrés oxidativo (Boutet et al., 2004; Manduzio et al. 2005).

En este trabajo, el nivel de expresión del gen *gst-s* mostró diferencias significativas entre los ostiones expuestos a las dietas mixtas *I. galbana* + *G. catenatum*, control tóxico y control no tóxico, entonces debido al papel importante que juega este gen en los procesos de detoxificación celular, probablemente esté involucrado en la regulación y metabolismo de los ostiones para eliminar las toxinas PST. En las dietas mixtas *I. galbana* + *G. catenatum* y el control tóxico el nivel de expresión de *gst-s* fue bajo durante las primeras 6 h de exposición, sin embargo, incrementó significativamente ($p < 0.05$) después de las 12 h en ambas condiciones. Se ha documentado, en este y en otros trabajos, que las primeras respuestas de *C. gigas* ante la presencia de *G. catenatum* van desde la disminución de la tasa de alimentación hasta el cierre de las valvas (Estrada et al., 2007), aunado a la disminución de palatabilidad del alimento como mecanismo de resistencia a daño tisular (Bardouil et al., 1993; Wildish et al., 1998; Lassus et al., 2004). Por lo tanto, este comportamiento podría explicar el bajo nivel de expresión durante las primeras horas; en el

caso de una exposición subcrónica, el incremento en el nivel de expresión se encontró en la dieta mixta de 30×10^3 cel mL⁻¹ y control tóxico en el día 7 de exposición.

La sobreexpresión de *gst-s* a largo plazo (exposición subcrónica) también ha sido reportada en *C. gigas* expuesto a contaminantes (Boutet et al., 2004). Las adaptaciones bioquímicas que involucran una respuesta de expresión génica contra xenobióticos, como la actividad GST, podría explicar en parte la resistencia de los consumidores a las amenazas químicas de los alimentos, además de proporcionar información sobre los mecanismos enzimáticos involucrados (Vrolijk y Targett, 1992; Whalen et al., 2008; Tomanek 2011). La inducción de *gst-s* con una dieta aleloquímica podría servir como un mecanismo de ajuste adicional de protección contra la toxicidad (Vrolijk y Targett, 1992; Whalen et al., 2008); este fenómeno podría estar sucediendo en nuestro sistema de estudio (dinoflagelado tóxico-ostión). Las diferencias en el nivel de transcripción entre los tratamientos podrían tener su base en los procesos de desintoxicación que normalmente se asocian con estrés (Manduzio et al., 2005; Lesser, 2006; Estrada et al., 2007).

Por otro lado, se ha encontrado que los ostiones presentan una alta acumulación de tóxicos en los tejidos (toxinas o metales) después de siete días de exposición (Shumway, 1991; Bricelj y Shumway, 1998); esto concuerda con nuestra observación del aumento del nivel de transcripción de *gst-s*. Por tanto, la sobreexpresión recurrente de dicho gen podría asociarse a un aumento de la resistencia del organismo a factores de estrés, incluyendo compuestos tóxicos (Vrolijk y Targett, 1992). Los resultados obtenidos contribuyen a una mejor comprensión de la función de *gst-s* y la presencia de mecanismos de resistencia hacia un dinoflagelado tóxico en su dieta.

También se dio seguimiento a la expresión del gen de la glutamina sintetasa (GS) y se encontró que fue regulado por la exposición al dinoflagelado en las dietas mixtas y en el control tóxico. La glutamina sintetasa (GS) es una enzima que juega un papel central en el metabolismo del nitrógeno, catalizando la reacción química entre el glutamato y el amonio para la formación de glutamina; su biosíntesis ayuda a limpiar de amonio algunos tejidos ya que convierte el nitrógeno en urea y aminoácidos, participa en la biosíntesis de nucleótidos, además, desempeña un papel importante en el sistema nervioso central donde recicla neurotransmisores de ácido glutámico (Keepeler, 2007). GS se encuentra en una amplia gama de organismos, incluyendo microorganismos, plantas y animales. En moluscos, la capacidad para la biosíntesis de glutamina es generalmente débil o ausente, sin embargo, también puede actuar como un mecanismo de desintoxicación de cationes de amoníaco (Tanguy *et al.* 2005). En respuesta al estrés generado por la exposición al dinoflagelado tóxico, los ostiones exhibieron diferentes resultados en la expresión de *gs* bajo exposición aguda y subcrónica, en términos de magnitud.

El efecto perjudicial de la presencia de las células tóxicas en los ostiones, considerándose hace evidente debido a la represión del nivel de expresión de *gs* a las 24 h post-exposición tanto en las dietas mixtas *I. galbana* + *G. catenatum* como en el control tóxico. El nivel más alto de expresión del gen *gs* se observó durante una exposición subcrónica. Al igual que con los otros genes mencionados anteriormente, el incremento del nivel de expresión de *gs* resultó altamente regulada tanto por la concentración de células de *G. catenatum* como por el tiempo de exposición. La sobreexpresión del gen que codifican para GS, una proteína de respuesta a estrés, ha sido estudiada en diversas especies de moluscos bivalvos como una respuesta ante la presencia de hidrocarburos (Boutet *et al.*, 2004a), hipoxia

(David et al., 2005), plaguicidas (Boutet et al., 2004; Tanguy et al., 2005; Collin et al., 2010) y exposición al dinoflagelados tóxicos *P. lima* (Romero-Geraldo y Hernández-Saavedra, 2012), y se ha observado que juega un papel fundamental en la resistencia de los organismos a estos factores de estrés. Recientemente, Bao *et al.* (2013) reportaron un incremento en el nivel de expresión de *gs*, en diferentes tejidos de la almeja *Tegillarca granosa* durante una exposición a *Vibrio challenge*, encontrando una mayor sobreexpresión en hemocitos y manto, por lo que mencionan que *gs* podría estar involucrado en reacciones inmunes.

La glutamina producida por la GS es necesaria para la síntesis de aminoácidos, purinas y pirimidinas, que son moléculas esenciales en la síntesis de proteínas (Keeper, 2007). En nuestra investigación observamos que GS se comporta como una proteína constitutiva e inducible a condiciones de estrés, por lo que el aumento en la expresión de *gs* podría ser el reflejo de un aumento en la síntesis de proteínas, lo que resulta esencial para la regulación de la homeostasis en los organismos. También podría estar implicada en el mecanismo de defensa inmune en respuesta al dinoflagelado tóxico, sin embargo, resulta arriesgado afirmarlo puesto que hacen falta más estudios para comprobar esta función.

La proteína de unión a LPS y β -1,3 glucano (LGBP) desempeña un papel crucial en la inmunidad innata de invertebrados (Girón-Pérez, 2010). La unión de lipopolisacárido y/o β -1,3 glucano a la LGBP, activa la cascada pro-fenoloxidasas, que es una respuesta general de estrés de naturaleza abiótica o biótica en invertebrados como *C. gigas* (Montagnani et al., 2007; Girón-Pérez, 2010). El mecanismo de defensa del hospedero puede dividirse en tres pasos esenciales: detección del microorganismo infeccioso, activación de las vías de

señalización intracelular y, finalmente, la activación del mecanismo efector (Girón-Pérez, 2010). La LGBP es una proteína de fase aguda que juega un papel crítico en las interacciones parásito-huésped, y es esencial en la respuesta general del sistema inmune innato de los invertebrados. Los resultados de esta tesis indican una respuesta diferencial en el nivel de expresión del gen que codifica la LGBP (*lgbp*), relacionada directamente con la concentración del dinoflagelado tóxico y con el tiempo de exposición; observamos una sobreexpresión de *lgbp* desde las primeras horas de inicio del bioensayo como bajo exposición subcrónica (14 días de exposición) en los ostiones alimentados en dieta mixta con *I. galbana* + 30×10^3 cel mL⁻¹ de *G. catenatum*. En los ostiones alimentados con el control tóxico (sólo *G. catenatum*), la activación de la respuesta inmune protectora, sugiere que los ostiones son capaces de identificar al dinoflagelado como un elemento extraño, que podría funcionar como un invasor potencial, y no ser necesariamente una respuesta asociada al deterioro fisiológico provocado por la toxina presente en *G. catenatum*. Sin embargo, dado el diseño experimental aplicado en este trabajo, así como la pregunta específica (el efecto de las microalgas como en un fenómeno FAN y no el efecto aislado de la toxina), para aislar e identificar el o los componentes de *G. catenatum* que pudieran ser los responsables de esta respuesta sería necesario fraccionar al dinoflagelado, de la misma forma como lo plantea Matus (2013) en su trabajo, al analizar el efecto de varias especies del género *Prorocentrum* y sus componentes (de forma aislada) en el perfil proteico 2D de ostiones juveniles de 3-5 mm. Aunque muchos estudios han evaluado los efectos dañinos de las algas y sus toxinas sobre el sistema inmunológico de bivalvos, las interacciones biológicas entre ellos son poco conocidos, sobre todo en un nivel molecular. El gen *lgbp* ha sido identificado en bibliotecas SSH de *C. gigas* expuesto a hidrocarburos donde observaron una sobreexpresión (Boutet et al., 2004) al igual que en una exposición a

parásitos protozoarios (Tanguy, 2004). Este trabajo proporciona la primera evidencia experimental de que la exposición de *C. gigas* a células tóxicas de *G. catenatum* incrementa (temporalmente) la expresión de *lgbp* y podría desempeñar un papel crítico en la interacción *C. gigas*-*G. catenatum*.

El citocromo P450 (CYP por su abreviación en inglés) es una enorme y diversa superfamilia de hemoproteínas encontradas en bacterias, archaea y eucariotas. Las proteínas del CYP usan un amplio rango de compuestos (exógenos y endógenos) como sustrato de sus reacciones enzimáticas. Por lo general, forman parte de la cadena de transferencia de electrones con multicomponentes denominadas sistema contenedoras de P450. La reacción más común catalizada por el citocromo P450 es una reacción de monooxigenasa, es decir, la inserción de un átomo de oxígeno molecular (O_2) en un sustrato orgánico (RH) a la vez que otro átomo de oxígeno es reducido a agua (Toledo-Silva et al., 2008).

El citocromo P450 constituye la primera defensa enzimática contra compuestos xenobióticos. La biotransformación de xenobióticos se realiza básicamente en dos fases: fase I, catalizada principalmente por el sistema de monooxigenasas dependiente del citocromo P450. Fase II, en la que participan una serie de transferasas que catalizan reacciones de conjugación de los xenobióticos con diversas moléculas de naturaleza endógena como ácido glucorónico, sulfatos, acetato, el tripéptido glutatión o algunos aminoácidos (Medeiros et al, 2008). Estas enzimas metabolizan una amplia variedad de sustratos, tales como ácidos grasos, hormonas y xenobióticos (Boutet et al., 2004). En organismos marinos, después de la exposición a aleloquímicos de corales gorgonia (Vrolijk y Targett, 1992) y a muchos otros contaminantes que típicamente se liberan de forma continua en el medio ambiente como hidrocarburos aromáticos policíclicos, metales

pesados (por ejemplo, Pb y Cu), y los productos químicos disruptores endocrinos (Tanguy et al., 2002; Boutet et al., 2004),

En este trabajo, la sobreexpresión del gen *cyp356A1* se encontró sobreexpresado en los ostiones alimentados con las dietas mixtas *I. galbana* + *G. catenatum* y el control tóxico principalmente en exposición subcrónica. Estas observaciones sugieren una participación importante de este gen en los procesos de detoxificación celular en los ostiones expuestos al dinoflagelado. De la misma forma que en los genes mencionados anteriormente, los cambios en el nivel de expresión de *cyp356A1* dependen tanto del tiempo de exposición como de la concentración de los dinoflagelados en los sistemas de ensayo.

Varios genes de esta superfamilia son altamente inducibles, particularmente por xenobióticos que se unen a receptores intracelulares específicos y por tanto modulan la expresión génica (Toledo-Silva et al., 2008). El gen que codifica para la proteína de la citocromo P450 principalmente la isoforma *cyp356A1* ha sido identificado previamente en *Crassostrea gigas*, encontraron un incremento en su nivel de transcripción en ostiones expuestos a efluentes domésticos (Toledo-Silva et al., 2008; Medeiros et al., 2008). Dicho gen, tiene gran similitud con la familia CYP17, que se asocia con el metabolismo de los esteroides y una menor similitud con la familia CYP1, que comprende CYP1A, comúnmente asociada con el metabolismo de hidrocarburos aromáticos policíclicos (Toledo-Silva et al., 2008). A pesar del debate que existe si la isoforma *cyp356A1* participa en procesos de biotransformación, Mello et al. (2012) reportaron una sobreexpresión de este gen en hemocitos de *C. gigas* expuesto a brevetoxinas (neurotoxinas) por lo que dedujeron que el gen *cyp356A1* tiene el potencial para participar en los procesos de

detoxificación durante el metabolismo de dichas toxinas. Por otro lado, una exposición a toxinas PST (STX pura) en hemocitos de *C. gigas* condujo a una represión en la transcripción de gen *cyp356A1* (Mello et al., 2013). En cambio, en el presente trabajo encontramos altamente sobrepresado este gen principalmente en los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I. galbana* + *G. catenatum* 30×10^6 cel mL⁻¹ (35 veces por arriba del control no tóxico), sin embargo, es importante recalcar que en este estudio se utilizaron las células completas del dinoflagelado. Es sabido que los bivalvos acumulan y metabolizan las toxinas PST, lo que resulta en metabolitos conjugados, oxidados, reducidos e/o hidrolizados (Bricelj y Shumway, 1998; Choi et al., 2006). Sin embargo, la biotransformación de la PST asociada a la actividad de la CYP450 ha sido escasamente descrita en *C. gigas*, por lo tanto, el incremento en el nivel de expresión de *cyp356A1* observado en nuestro trabajo, abre la oportunidad de estudiar cómo está implicada la enzima, y cómo ocurre esta asociación. Además, el reciente genoma secuenciado de *C. gigas* reveló que contiene una gran número de genes *cyp* (Zhang et al., 2012), por lo que la expresión de otras isoformas CYP deberían también examinarse antes de establecer conclusiones definitivas.

8.3 Efecto de *G. catenatum* en la expresión de genes de regulación del ciclo celular, citoesqueleto, inflamación, apoptosis y cadena respiratoria en *C. gigas* de 3 ± 1 mm

A pesar de existen extensos estudios acerca de efectos adversos mediados por PST, aún puede considerarse que hay poca información sobre su efecto en la expresión de genes,

conocimiento que permitiría comprender detalladamente los mecanismos de la toxicidad inducida por este tipo de toxinas.

En este estudio se encontró un incremento en el nivel de transcripción de algunos genes que participan en la regulación del ciclo celular (*p21*, *p53*, *caf p55* y *ef2*), en procesos de inflamación (*casp1*) y del citoesqueleto (*act* y *tub β*), como respuesta a la exposición de *C. gigas* a *G. catenatum*. Los genes estudiados fueron seleccionados con base en sus papeles fisiológicos y porque pueden funcionar como una herramienta sensible para detectar cambios cuando los ostiones son expuestos a dinoflagelados tóxicos. En todos los tratamientos, los cambios en el nivel de expresión resulto tiempo- y concentración-dependiente. Por otro lado, la consideración de un control tóxico en el diseño experimental (tratando de aislar el efecto de la toxinas en una dieta que consiste solamente en *G. catenatum*, considerada como control positivo a la toxina), confirma el impacto del dinoflagelado tóxico *per se* sobre los genes estudiados, tomando como base la homeostasis en *C. gigas* (ostiones alimentados con *I. galbana*). Además, como se mencionó anteriormente, la magnitud de los cambios y los efectos particulares pueden tener su base en la susceptibilidad particular de cada gen a las toxinas y/o algún otro componente (o componentes) del dinoflagelado. Con la dieta mixta con la mayor concentración de *G. catenatum* (30×10^3 células mL⁻¹), los ostiones no pudieron compensar el daño causado por la exposición, manifestándose como daños en los tejidos (cambios notables en los túbulos de la glándula digestiva, intestino, manto, branquias y el tejido muscular).

Los genes implicados en la regulación del ciclo celular, mostraron diferentes patrones de expresión en comparación con otros genes, principalmente en las dietas mixtas de *I.*

galbana + *G. catenatum* con 3×10^3 y 30×10^3 células mL^{-1} . Los genes *ef2*, *p21* y *p53* se sobre expresaron principalmente a los 7 días.

El gen *waf1* o *p21* codifican una proteína que funciona como un potente inhibidor de quinasa dependiente de ciclina (inhibidor de CDK), que se une e inhibe la actividad de los complejos de ciclina CDK2 y CDK4. Por lo tanto, esta proteína funciona como un regulador de la progresión del ciclo celular en la fase G1 controlado por la proteína p53. En esta fase sucede el crecimiento celular con síntesis de proteínas y de ARN, básicamente, es el período que transcurre entre el fin de una mitosis y el inicio de la síntesis de ADN. Tiene una duración de entre 6 y 12 horas, y durante este tiempo la célula duplica su tamaño y masa debido a la continua síntesis de todos sus componentes, como resultado de la expresión de los genes que codifican las proteínas responsables de su fenotipo particular. Durante esta fase la proteína supresora de tumores p53 controla estrechamente la expresión de *p21*; a través de la proteína p21 se medía la fase de detención del ciclo celular G1 dependiente de p53, en respuesta a una variedad de estímulos de estrés (Tyler et al., 1996; Böttger et al., 2008).

p53 es un gen supresor de tumores, es una de las proteínas más intensivamente estudiadas y estas pueden regular varias funciones celulares mayores incluyendo transcripción de genes, síntesis de ADN, reparación del ADN, regulación del ciclo celular, apoptosis y muerte celular (Tyler et al., 1996; Chao et al., 2000; Farcy et al., 2008b). Bajo condiciones en las cuales el ADN es dañado, p53 media la reparación del ADN, detención del ciclo celular y apoptosis, en gran medida a través de la transactivación de genes blanco específicos. La diversidad en las funciones de *p53* son reflejadas en una amplia variedad de genes blanco

que son selectivamente trans activados dependiendo del tipo y severidad del estímulo de estrés y sobre los residuos de aminoácidos específicos de P53 que son fosforilados o acetilados (Culmsee y Mattson, 2005). Un incremento en la proteína P53 a través del ADN dañado conduce a la detención del ciclo celular en G1 y/o G2, dando tiempo para que se dé la reparación del ADN, e inducir a apoptosis si el daño es severo (Culmsee y Mattson, 2005). La detención del ciclo celular involucra la activación transcripcional de p21/WAF1, un inhibidor de cinasa dependiente de ciclina. La expresión de *p53* ha mostrado responder a una variedad de cambios en condiciones ambientales (Tyler et al., 1996; Böttger et al., 2008). Sin embargo, los estudios que se centran en las funciones de reparación del ADN, detención del ciclo celular y apoptosis, son todavía limitados, principalmente porque la falta de información acerca de otras moléculas mediadas por *p53* y estudios de líneas celulares adecuadas para organismos acuáticos, se basan principalmente por lo que hay establecido para los estudios en mamíferos (Chao et al., 2000; Farcy et al. 2008b).

El gen supresor de tumores *p53* se considera que es el principal sensor de estrés genotóxico debido a que es la vía de unión entre el ADN dañado, detención del ciclo celular y la apoptosis (Chao et al., 2000).

Con base a lo anterior, la expresión de los genes *p21* y *p53* fue examinada en los ostiones alimentados con las dietas mixtas de *I. galbana* + *G. catenatum* con 3×10^3 y 30×10^3 células mL⁻¹ y el control tóxico (sólo *G. catenatum*), como un marcador para la vía de detención del ciclo celular. La expresión de *p53* fue principalmente regulado después de 7 días de exposición al dinoflagelado.

En los ostiones expuestos a sólo *G. catenatum* también se observó un aumento en el nivel de transcritos de *p21*. Esto sugiere que la detención del ciclo celular en el ostión, a través de la activación transcripcional de *p21*, podría funcionar para prevenir la replicación de las células dañadas. Probablemente estas células son eliminadas vía apoptosis, ya que este proceso desempeña un papel importante en la sucesión y la transmisión de enfermedades en ostiones (Sunila y Labanca, 2003); entonces, la apoptosis podría causar el deterioro fisiológico de los organismo y, al final, la muerte si la exposición al dinoflagelado tóxico perdura por un largo tiempo (exposición crónica).

El factor 1 de ensamblaje de cromatina subunidad p55, es una proteína que actúa en la acetilación de las histonas (histona acetiltransferasa), y está relacionado con la regulación de la transcripción a través de diferentes procesos celulares; el montaje y la maduración de la cromatina están codificados por CAFp55. CAFp55 es una proteína chaperona de histonas que juega un papel crítico en el ensamblaje de la cromatina, que esta acoplado a la replicación y reparación del ADN. Este factor, se compone de tres subunidades diferentes (55, 60, y 150 kDa), de los que la subunidad de 55 kDa es un componente de varios complejos de proteínas involucradas en la remodelación de la cromatina (Taylor-Harding et al., 2004); los eventos de remodelación también están asociados con la reparación del ADN (Meijer y Smerdon, 1999). En este estudio, se encontró que el nivel de transcripción de *caf* p55 alcanzó el valor máximo en al tratamiento con 30×10^3 cel mL⁻¹ a los 7 días de exposición. El aumento en la expresión de *caf* p55 se puede relacionar estrechamente con el aumento de la expresión observado en *p21* y *p53*, por lo que puede considerarse la función de estos tres genes es indispensables para el correcto funcionamiento de los mecanismos celulares de la replicación y reparación del ADN. El papel regulador de los factores de

ensamblaje como CAF-1, en el establecimiento de estos estados de la cromatina y su herencia a través del desarrollo del ciclo celular, requiere de un estudio más riguroso.

Con base en la observación de un alto nivel de transcripción observado en este grupo de genes en *C. gigas* expuesto a dieta mixta con 3×10^3 cel mL⁻¹ de *G. catenatum*, sugerimos que el tratamiento no induce daño en los puntos de control de reparación del ADN, haciendo posible la restauración de la homeostasis en los organismos. Sin embargo, esto podría no suceder en *C. gigas* expuestos a 30×10^3 cel mL⁻¹, donde la posible alteración de los puntos de control del ciclo celular provoca daño irreversible en el ADN y, por ende, el deterioro de los organismos ya que las lesiones observadas en los tejidos son graves.

El factor de elongación 2 o translocasa, pertenece a la familia de GTPasas, es una enzima que participa en el proceso de elongación durante la síntesis de proteínas. En esta investigación, se observaron niveles elevados de expresión de *ef2* desde el primer día de exposición a *G. catenatum*, comportamiento que coincide aquel observado en *caf p55*, *p21* y *p53*. Por lo tanto, ante esta condición de estrés los ostiones requieren una mayor producción de proteínas para contrarrestar el efecto, lo que se refleja como un incremento en la transcripción de los otros genes. En estudios previos, otros autores han documentado que los factores de transcripción son los primeros en responder a la exposición a neurotoxinas de diatomeas (Salierno et al., 2006; Lefebvre et al., 2009).

En este trabajo, también se observó que el gen *casp1* fue altamente regulado en todos los tratamientos a los 7 d de exposición. La familia de las caspasas desempeña un papel muy importante en la apoptosis. Entre los 14 miembros conocidos de la familia, la caspasa 1 juega un papel crítico en la ejecución del proceso de la inflamación, lo que al final conduce a apoptosis (Chen et al., 2001). Por lo tanto, las lesiones en los tejidos y la infiltración de

hemocitos observados en los ostiones alimentados con *G. catenatum* podrían estar involucrados en la regulación de una respuesta inflamatoria y de apoptosis.

Como consecuencia de la exposición a *G. catenatum* se observó que en *C. gigas* los genes que codifican proteínas del citoesqueleto también fueron modulados. En este estudio, se observó una clara modulación de la expresión del gen de actina (*act*) en relación a la concentración de *G. catenatum* y al tiempo de exposición, a pesar de que generalmente se utiliza como un gen constitutivo. La actina, pertenece a una familia de proteínas altamente conservadas y constitutivamente expresadas en todas las células eucariotas, implicadas en la formación de filamentos, que son el componente principal del citoesqueleto. Esta estructura de soporte celular es una red dinámica de polímeros de actina y una variedad de proteínas asociadas que participan en importantes funciones celulares. Lacoste (2001) reportó cambios en el citoesqueleto por factores de estrés tales como metales pesados y temperatura. En estudios anteriores, se demostró el efecto del parásito *P. marinus* en el reacomodo del citoesqueleto (Gruenheid y Finlay, 2003). Así mismo, Tanguy y Ford (2004) reportaron la sobre-regulación de *act* y *tub* en *C. virginica* y *C. gigas* expuestos a *P. marinus*.

Por otra parte, la tubulina también es un componente importante del citoesqueleto. Los microtúbulos están involucrados en diversos procesos celulares que implican el movimiento de las vesículas secretoras, movimiento de orgánulos, transporte de sustancias intracelulares, así como la división celular (mitosis y la meiosis). El aumento de la expresión de este gen puede asociarse con el estrés generalizado, provocando un aumento en la síntesis de varias moléculas intracelulares, aumentando el transporte a través de las células para tratar de compensar el daño. Los resultados de este trabajo sugieren que el gen *tub* β podría desempeñar un papel importante, pero aún no identificado, en el

reordenamiento de procesos celulares en los ostiones alimentados con *G. catenatum*. Todas estas observaciones sugieren que las diferentes funciones celulares implicadas en la respuesta al estrés tóxico (regulación del ciclo celular y el citoesqueleto) están estrechamente interconectadas.

Las toxinas paralizantes son moléculas estables al calor y altamente hidrofílicas, la célula blanco donde actúan son las células nerviosas y bloquean específicamente los canales de sodio dependiente de voltaje. Debido a su característica hidrofílica no pueden atravesar la membrana celular por lo que se unen de manera reversible al sitio 1 del canal de sodio, bloqueando así el poro (FAO, 2005). Al no poder ingresar a la célula las toxinas PST no puede actuar de manera directa. Sin embargo, el bloqueo promovido podría funcionar como una señal extracelular para fosforilar o desfosforilar proteínas que se encuentran en la membrana, que a su vez activan segundos mensajeros, ocasionando así una cascada de respuestas alterando a nivel celular la expresión de los genes.

La enzima COI pertenece a la clase de las óxido reductasas y cataliza el último paso de la cadena de transporte de electrones, transfiriéndolos a moléculas de oxígeno y reduciéndolos finalmente a agua (Achard-Joris et al., 2006); además, la COI puede contribuir a la protección de la célula por los daños producidos por ROS (Buggr et al., 2007). La exposición a condiciones de estrés (metales pesados, contaminantes, toxinas) podrían requerir una mayor demanda energética para los procesos de reparación tisular, protección celular y procesos de detoxificación, dado que estos modos de protección implican un incremento en el costo energético celular (Li et al., 2002). El gen que codifica la COI fue sobre expresado en los tratamientos de 3×10^3 y 30×10^3 cel mL⁻¹ a los 7 días de

exposición; esto corrobora la situación de estrés sufrido por los ostiones ante la presencia e ingestión de *G. catenatum*, ya que los ostiones se mantuvieron metabólicamente activos.

Por otra parte, la tripsina es una proteasa que posee funciones reguladoras en diferentes procesos fisiológicos, como la coagulación (Takada et al., 1994), el desarrollo (Konrad et al., 1998), la embriogénesis (Hong y Hashimoto, 1995), la digestión (Neurath, 1984), la inflamación (Hiemstra, 2002) y la respuesta inmune (Gorman et al., 2000). En moluscos bivalvos como el mejillón *M. chilensis* se ha observado un incremento en la actividad de enzimas importantes en la digestión y absorción de nutrientes cuando es alimentado con dinoflagelados productores de toxinas PST *A. catenella* así como un ajuste en la actividad de carbohidrasas (amilasas, laminarasa, celulasa) (Fernández- Reiriz et al., 2008). en este trabajo se encontró que el nivel de transcripción del gen (*tryp*) que codifica para tripsina (TRYP), incremento significativamente en los ostiones alimentados con las dietas mixtas de 3×10^3 y 30×10^3 cel mL⁻¹ a los 7 días de exposición, mientras que 7 días después (14 días de exposición) la transcripción se reprimió casi completamente. Sin embargo, tomando como base los resultados obtenidos en este trabajo no se podría afirmar que la sobre expresión *tryp* este dada por el cambio en la dieta, ya que para el procesamiento de las muestras y análisis de expresión se procesaron los organismos completos (ostiones de 3 ± 1 mm de tallas), por lo que no se separó la glándula digestiva; en los ostiones de mayor talla (más adelante) no se obtuvieron elementos suficientes para asegurar que el incremento en el nivel de transcrito se deba a un incremento de la capacidad digestiva en presencia del dinoflagelado.

En este trabajo, queda demostrado el efecto tóxico causado por células completas de *G. catenatum*, es importante considerar que subproductos metabólicos distintos de las toxinas

pueden contribuir a la efectos observados afectando a las membranas celulares o sistemas de órganos en particular, que en suma podrían afectar la salud de los organismos y finalmente conducir a la adquisición de una enfermedad. Además, aquí se presenta la primera evidencia de que la exposición a las células tóxicas de *G. catenatum* genera un aumento en el nivel de expresión de genes que codifican proteínas implicadas en varios tipos de respuesta: a estrés, antioxidante, detoxificación, de defensa inmune, inflamación y regulación del ciclo celular. Si bien estos genes son los que responden inmediatamente a un estímulo estresante en los organismos, también se mantienen sobre expresados en un mediano plazo, posiblemente contrarrestando el daño generado.

Así mismo, queda demostrado que en *C. gigas* una baja concentración de *G. catenatum* y/o por un periodo corto de exposición, son suficientes para modular (sobre expresar o reprimir) la expresión de los genes antes mencionados, y que una exposición subcrónica induce cambios mayores en los perfiles de expresión de los genes analizados. Por lo tanto, la tensión inducida por *G. catenatum* durante los eventos naturales, probablemente aumenta la susceptibilidad de los ostiones a la invasión por patógenos oportunistas, por lo que las poblaciones de ostiones (y muy probablemente las de otros moluscos) podrían morir por infecciones secundarias.

Con la información aquí generada, se pueden plantear estudios adicionales, especialmente diseñados, que puedan proporcionar más adelante una mayor comprensión de cómo *G. catenatum* y/o sus toxinas activan/desactivan el sistema de defensa de *C. gigas*. Por su parte, Vasconcelos et al. (2010) señalan que las toxinas producidas por dinoflagelados afectan a la integridad de los organismos acuáticos en las primeras fases de desarrollo, ya

que los invertebrados marinos no tienen sistemas enzimáticos eficaces para la desintoxicación, haciéndolos más susceptibles dadas sus altas tasas metabólicas

8.4 Efecto de *G. catenatum* en la expresión de genes de regulación del ciclo celular, citoesqueleto, inflamación y apoptosis, en glándula digestiva de *C. gigas* de 50 ± 10 mm

La glándula digestiva es el principal órgano blanco donde se acumulan las toxinas PST, de ahí la importancia de monitorear la expresión de los genes seleccionados en este estudio. Además, la glándula digestiva es de particular importancia porque es el sitio donde se lleva a cabo el procesamiento del alimento y de otros compuestos como xenobióticos y toxinas. Entonces, al ser el órgano responsable de los procesos de detoxificación, la glándula digestiva está sujeta a altos niveles de estrés oxidativo, que podría generar daño a moléculas esenciales como al ADN, proteínas, lípidos etc. Como se mencionó anteriormente, un incremento en el nivel de transcripción de los genes involucrados en la regulación de ciclo celular (*p21*, *p53*, *cafp55*) es indicativo de la activación de mecanismos de replicación y reparación del ADN dañado a nivel celular.

Los cambios en la forma de la célula pueden conducir a alteraciones en la estructura del citoesqueleto (Runnegar y Falconer, 1986). Por lo tanto, las modificaciones observadas en los tejidos (principalmente de los túbulos de la glándula digestiva, intestino, branquia y manto) inducidas por la exposición al dinoflagelado ocasionaron alteraciones en la organización de citoesqueleto, y muy probablemente en la redistribución de los filamentos de actina, microtúbulos y otras proteínas asociadas a actina, generando así modificaciones

en los niveles de transcripción de los genes que las codifican. Por tanto, el mecanismo tóxico de PST en las células de los ostiones podría ser similar al reportado por otras neurotoxinas como las micotoxinas en peces, moluscos y células de mamífero (Levefre et al., 2009).

8.5 Efecto de *G. catenatum* en la expresión de genes de respuesta inmune en hemocitos de *C. gigas* de 50 ± 10 mm

Los hemocitos pueden estar implicados en una amplia variedad de procesos fisiológicos, como pueden ser los mecanismos de digestión o de excreción (Haberkorn et al., 2010a, Mello et al., 2012), de transporte y procesos de reparación de la concha en moluscos (Scotti et al., 2007; Haberkorn et al., 2010a). Sin embargo, la función principal de estas células es la defensa contra agentes patógenos (Bayne et al., 1980) al intervenir en una serie de reacciones inmunes esenciales para la supervivencia de bivalvos en el ambiente (Mello et al., 2012). El impacto en el sistema inmune de bivalvos a especies de algas nocivas y sus ficotoxinas asociadas es actualmente objeto de debate y, en la actualidad, existen pocos estudios.

Los hemocitos pueden tener múltiples oportunidades de estar en el contacto directo con las toxinas durante los eventos de FAN. En primer lugar, en la cavidad paleal donde hemocitos se encuentran protegiendo al hospedero de patógenos potenciales, incluso antes de la invasión (Allam et al., 1998). En segundo lugar, después de la alimentación por filtración y la digestión de las algas dañinas, cuando las toxinas intracelulares son liberadas y terminan

en los tejidos animales y en el sistema vascular semi-abierto donde los hemocitos son abundantes (Ford et al., 2008). Ford et al. (2008) plantean que los hemocitos pueden migrar a través del epitelio intestinal, fagocitando las algas parcialmente digeridas y posteriormente regresar a la circulación en la hemolinfa. Por otra parte, Franchini et al. (2003) demostraron a través de inmunolocalización una gran cantidad de yesotoxinas en el citoplasma de hemocitos de mejillones. En este trabajo, los genes de respuesta inmune estudiados en hemocitos de *C. gigas* (*lgbp*, *cvt* e *ifi44*) resultaron altamente regulados en los ostiones expuestos a *G. catenatum* principalmente a las 24 horas de exposición en dietas mixtas y en la dieta con solo el dinoflagelado (control tóxico).

Como se mencionó anteriormente, el LGBP juega un papel crítico en las interacciones parásito-huésped. En juveniles de 50 ± 10 mm el mayor nivel de expresión del gen *lgbp* se encontró al comienzo del experimento en los ostiones alimentados con el control tóxico, y fue disminuyendo con el transcurso del bioensayo. Sin embargo, en los organismos alimentados con la dieta mixta *I. galbana* + *G. catenatum* 6×10^3 cel mL⁻¹, el nivel de expresión alcanzó su máximo nivel al final del bioensayo (día 7). Por lo tanto, estas observaciones corroboran la activación de la respuesta inmune inmediata para proteger a los ostiones alimentados con sólo *G. catenatum* al modular inmediatamente dicho gen.

También se analizó la expresión del gen *cvt* que codifica una proteína llamada Pernina o cavortina; esta proteína fue descubierta por primera vez en el mejillón *Perna viridis* (Scotti et al., 2007). La carvotina (CVT) es una proteína no pigmentada, glicosilada con actividad de inhibición de serin-proteasas, que se asocia con hierro lo que indica que puede funcionar como agente quelante del hierro. La CVT es una proteína común en la hemolinfa y está

constituida por un sólo dominio derivado de la superóxido dismutasa SODC, también se ha encontrado en moluscos bivalvos del género *Crassostrea* (Scotti et al., 2001). Esta proteína tiene varias funciones: 1) como una proteína de defensa en ostiones expuestos a microorganismos patógenos y químicos peligrosos; 2) como hemaglutinina, si bien no aglutina bacterias, incrementa la fagocitosis de partículas extrañas; y 3) como lactoferrina, al secuestrar hierro puede efectuar una acción antibacterial. Con base a lo anterior, la CVT puede tener un papel muy importante en la sobrevivencia y el mecanismo de defensa en *C. gigas*.

Algunos estudios han demostrado sobreexpresión del gen de la cavortina (*cvt*) en juveniles seleccionados de *C. gigas* por resistencia a la mortalidad de verano (Huvet et al., 2004). Tanguy et al, 2004 también observaron expresión diferencial de *ctv* en *C. virginica*, donde encontraron un aumento de tres veces la expresión del ARNm de *cvt* después de 45 días de exposición a la infección con el protozoario *P. marinus*; demostrando así el papel importante que juega este gen en la defensa de los organismo. En un estudio más reciente, se reportó la sobreexpresión de la proteína CVT en juveniles de *C. gigas* expuestos a extractos de dinoflagelados del genero *Prorocentrum* (Matus, 2013). Sin embargo, el presente trabajo, es el primer reporte de la modulación (sobreexpresión) de *ctv* en *C. gigas* como respuesta a la exposición a *G. catenatum* productor de toxinas paralizantes.

El *if44* es un gen inducible específico de interferón, está implicado en defensa antiviral; fue reportado por primera vez en el hígado de chimpancés infectados con el virus de la hepatitis C (Kitamura et al., 1994). Este gen también muestra actividad antiproliferativa, posiblemente contribuyendo a la detención del ciclo celular ya que provoca una

disminución de GTP celular y suprime la señalización de cinasas reguladas por una señal extracelular (Hallen et al., 2007). Green et al. (2009), reportaron un gen homólogo en el ostión de roca *Saccostrea glomerata*, este gen fue significativamente sobre expresado en organismos con neoplasia. Por otro lado, Renault et al. (2011), reportaron la sobreexpresión de *if44* en hemocitos de juveniles de *C. gigas* 24 y 48 horas después de una exposición a herpes virus (OSHV-1). En el presente trabajo, el nivel de expresión del gen *if44* también fue altamente modulada en hemocitos de *C. gigas* como respuesta a la presencia de *G. catenatum*. La sobreexpresión fue mayor durante el primer día de exposición en los ostiones alimentados con la dieta mixta de *I galbana* + *G. catenatum* (6×10^3 cel mL⁻¹) (9 veces arriba del nivel basal) y con el control tóxico (6×10^3 cel mL⁻¹) 16 veces arriba del nivel basal). Estos resultados corroboran que este gen, efectivamente, está implicado en la primera fase de respuesta inmune innata y (que al igual que con los genes previamente mencionados) el ostión reconoce a la célula del dinoflagelado o las toxinas PST una vez liberadas en el tracto digestivo como agentes dañinos que deben ser neutralizados.

El gen *hsp70* también se sobreexpresó principalmente en el primer día de exposición al dinoflagelado tanto en la dieta mixta de *I galbana* + *G. catenatum* (6×10^3 cel mL⁻¹) como en el control tóxico solo *G. catenatum* (6×10^3 cel mL⁻¹). Las HSP (Heat Shock Proteins) han sido ampliamente estudiadas y se conocen como proteínas de choque térmico. Sin embargo, se ha demostrado que la expresión de estas proteínas también puede inducirse por otros estímulos como la carencia de oxígeno, la presencia de metales pesados, agentes físicos y químicos, o cualquier factor que produzca un estrés celular (Santoro, 2000; Fabbri, 2008). A pesar de que la expresión de estas proteínas puede ser modulada por el estrés, en condiciones normales su principal función está asociada a procesos de plegamiento

proteico, donde actúan como *chaperonas* ayudando a la adquisición de una estructura tridimensional de las proteínas biológicamente activa, teniendo un papel fundamental en procesos de desarrollo y de diferenciación celular (Feder y Hofmann, 1999; Fabbri et al. 2009; Tomanek, 2011).

La implicación de estas proteínas en procesos de estrés se ha descrito en algunas especies de organismos acuáticos (Sanders, 1993; Snyder et al., 2001). Aunque de forma tradicional se ha utilizado la expresión de las HSP como marcador en procesos de estrés y contaminación (Sanders y Martin, 1993; Sanders et al., 1994; Feder y Hofmann, 1999; Cruz-Rodríguez et al., 2000; Porte et al., 2001), su modulación también se ha relacionado con procesos inmunes, ya que su expresión se ha visto incrementada tras la estimulación de los hemocitos con *Vibrio anguillarum* (Song et al., 2006; Gestal et al., 2007; Cellura et al., 2007). Además, se han encontrado varias ESTs con homología a HSP en varias librerías construidas tras una estimulación bacteriana o parasitaria (Tanguy et al., 2004; Kang et al., 2006; Gestal et al., 2007), refrendando la hipótesis de su posible papel en los mecanismos de defensa. En otro estudio se ha demostrado que *V. anguillarum* es capaz de aumentar la síntesis de la *hsp70* en el mejillón del Mediterráneo, teniendo su punto más alto de expresión a las 48 horas después de su inoculación (Cellura et al., 2007). Otros estudios reportaron aumento en los niveles de transcripción de *hsp70* en hemocitos de *C. gigas* expuestos durante 4 h a extractos de brevetoxinas (Mello et al., 2012) y a células completas de un dinoflagelado productor de PST *A. minimum* y a la saxitoxina pura (Mello et al., 2013).

Los estudios anteriores, junto con el resultado obtenido en el presente trabajo, apoyan el papel de *hsp70* como proteína de respuesta general al estrés. La regulación al incremento de la *hsp70* de forma recurrente podría estar asociada a aumentos en la resistencia de los animales a factores de estrés, incluyendo compuestos tóxicos (Song et al., 2006). Por otro lado, es importante destacar que el genoma secuenciado de *C. gigas*, reveló que el ostión del Pacífico contiene 88 genes de *hsp70*, mucho más que los 17 genes descritos en humanos (Zhang et al., 2012). En asociación a nuestros resultados, este número elevado de chaperonas refuerza la importancia de las HSP70 en el ostión, en respuesta al estrés generado por la adaptación al medio marino. Además, la modulación del gen *hsp70* en hemocitos de *C. gigas* expuestos a *G. catenatum* probablemente también esté relacionada a procesos inmunes, por lo tanto, es importante analizar otros genes relacionados a las *hsp70*, para entender más a detalle esta respuesta.

8.6 Daños histológicos en *C. gigas* de 3 ± 1 mm y 50 ± 10 mm por efecto de *G.*

catenatum

Las lesiones y los cambios estructurales del epitelio gastrointestinal son indicadores importantes de la salud en moluscos bivalvos (Elston, 1999). Las alteraciones estructurales se presentan con mayor frecuencia en la glándula digestiva y se componen de aplanamiento celular, inflamación, ruptura, exfoliación y metaplasia (Wikfors y Smolowitz, 1993). Algunos de estos cambios pueden ser reversibles, cuando se deben a cambios temporales en el medio ambiente, pero otras manifestaciones patológicas como la exfoliación epitelial, cuando es grave y que conlleva pérdida de células epiteliales, puede ser irreversible siendo

una condición terminal (Elston, 1999). Probablemente esta condición sucede en los ostiones alimentados con la dieta mixta *I. galbana* + *G. catenatum* 30×10^3 cel mL⁻¹, debido a que los epitelios mostraron una grave exfoliación epitelial, aunado a que con dicho tratamiento también se observó el mayor incremento en la expresión de la mayoría de los genes analizados, para tratar de reestablecer la homeostasis celular.

Elson (1999) ha reportado que la pérdida de la altura normal de las células de los túbulos de la glándula digestiva y el aplanamiento del epitelio puede ocurrir durante los períodos de abundante fitoplancton. Estas observaciones sugieren que los elementos tóxicos de ciertas especies de fioplancton, o de otras fuentes, pueden resultar en la reducción de la alimentación o un efecto tóxico directo. La altura del epitelio de las células de absorción puede ser categorizada como alta (normal), media y baja. Una altura elevada del epitelio representa una condición normal y un proceso de digestión del metabolismo de absorción activo; la altura media indica una condición de reducción en la alimentación y, por lo tanto, del metabolismo; y finalmente la altura baja de las células del epitelio se considera una condición patológica. En todo caso, la altura baja de las células de la glándula digestiva indica una reducción considerable en la alimentación que podría resultar en la disminución del crecimiento en condiciones de cultivo (Elson, 1999). La disminución en la altura del epitelio de los túbulos digestivos podría explicar la disminución significativa en la tasa de aclaramiento observada en los ostiones alimentados con la dieta mixta con 30×10^3 cel mL⁻¹ de *G. catenatum*.

Por otro lado, los ostiones juveniles pueden ser afectados por la exfoliación aguda del epitelio digestivo. En algunos casos, las células epiteliales individuales de los órganos del

tracto digestivo, más comúnmente las células de absorción de las glándulas digestivas, se desprenden de las células vecinas y cubren el lumen de la glándula. El proceso es progresivo y, en casos avanzados, casi todo el epitelio de la glándula digestiva se exfolia y se funde en el lumen de órganos. La afección a menudo es fatal debido a la gran pérdida de epitelio del tracto digestivo (Elson, 1999; Goslin, 2003). Como resultado, el lumen del órgano contiene restos celulares, principalmente gránulos y vacuolas de las células de absorción. Posteriormente, la secreción y células indiferenciadas restante, se extienden para cubrir los espacios dejados por las células de absorción exfoliadas, impartiendo así un aspecto metaplásico anormal en el órgano. El resultado de esta condición no se conoce, pero se cree que la recuperación es posible, se ajusta a la definición de metaplasia, la cual es un cambio reversible en la que un tipo de célula adulta reemplaza a otro tipo de célula adulta (Elson, 1999; Goslin, 2003). Las exotoxinas de algas o traumatismos mecánicos causados por las células de algas podrían ser una la base etiológica de estas condiciones. Pearce et al. (2005), reportaron el aplanamiento y la disminución de la altura de las células del epitelio, así como un alto grado de exfoliación epitelial, en *C. gigas* expuesto al dinoflagelado *P. rhathymum*.

En el presente trabajo, la inflamación de los tejidos observado en el grupo experimental (expuesto a *G. catenatum*) se caracterizó por una alta migración de hemocitos hacia dentro de los epitelios de diferentes órganos (diapédesis), desintegración de epitelios, necrosis y presencia de células anormales. Algunos autores sugieren que la diapédesis de hemocitos a través de los epitelios del tracto digestivo ocurre con el fin de eliminar las toxinas y así proteger los tejidos de la toxicidad, como una respuesta neutralizante a los daños por dichos

compuestos, es decir como una vía de desintoxicación (Hégaret et al., 2008 a,b, 2009; Haberkorn et al., 2010).

Además, las alteraciones del músculo estriado (posible atrofia), fueron mayores en los ostiones alimentados con la dieta mixta de 30×10^3 cel mL⁻¹ y el control tóxico. En cambio en los ostiones de 50 ± 10 mm, no se observaron cambios visibles en el tejido muscular como los encontrados en los ostiones más pequeños, cabe mencionar que posiblemente el tiempo que duro el bioensayo en los ostiones de mayor talla, no fue suficiente para ocasionar daños. Sin embargo, si se observaron cambios similares en la glándula digestiva, intestino, branquia entre los ostiones de ambas tallas.

Las modificaciones de la estructura y actividad muscular han sido previamente reportados en bivalvos expuestos a dinoflagelados productores de PST. En un estudio realizado por Hégaret et al. (2007), encontraron que el musculo aductor de *C. virginica* sufrió parálisis al exponer a los organismos al dinoflagelado *A.fundyense*. Recientemente, Tran et al. (2010) reportaron cambios de comportamiento en *C. gigas* expuesto a *A. minutum* como aumento de duración de la apertura de la valva, producción de pseudoheces, disminución en la tasa de filtración y cierre anormal de las valvas, este último cambio fue relacionado con la disfunción del músculo aductor. Hégaret et al. (2009) observaron que los músculos aductores de *Ruditapes philippinarum* fueron alterados después de la exposición a *P. minimum*. Por otro lado, el músculo aductor de ostiones expuestos a *A. minutum* fueron intensamente afectados presentando amiotrofia, degeneración hialina y alteración del patrón ondulado de las fibras musculares (Haberkorn et al., 2010). Dichos cambios de la estructura del tejido muscular pueden estar asociados con la parálisis muscular observada durante la

exposición a *Alexandrium* en *C. virginica* (Hégaret et al. 2007b) y en *Mytilus edulis* (Galimany et al., 2008). Por lo tanto, modificaciones de la estructura y la actividad muscular pueden afectar posiblemente la respiración y los procesos de nutrición llevando así al deterioro de la salud de los organismos (Frank et al., 2007; Hégaret et al., 2012).

Los daños observados en las branquias como desorganización del epitelio e infiltración de hemocitos a nivel del tejido conjuntivo, además de alteración de los filamentos branquiales, fusión y pérdida de la ciliatura; pueden explicarse considerando que las branquias son el primer órgano de contacto directo con las células tóxicas durante los procesos de filtración. El mayor grado de alteración en los ostiones expuestos a *G. catenatum* fue en la dieta mixta de 30×10^3 cel mL⁻¹ y el control tóxico. Haberkorn et al. (2010) mostraron que las branquias se vieron afectados por la exposición *A. minutum*, encontrando un aumento significativo en la producción de moco en ostiones expuestos a *A. minutum*.

9. CONCLUSIONES

- La comparación de los ostiones expuestos a dietas mixtas con *G. catenatum* y los expuestos al control no tóxico (dieta con *I. galbana*) nos permitieron confirmar, que los ostiones se alimentan activamente y tiene la capacidad de ingerir las dos microalgas.
- *C. gigas* en todos los casos (dietas mixtas y control tóxico en juveniles de 3 ± 1 mm y 50 ± 10 mm) mostró cambios visibles en su comportamiento alimenticio cuando estuvo en contacto con las células tóxicas: cierre inmediato de valvas, producción de pseudoheces y moco, retracción del manto y disminución de la tasa de aclaramiento.
- Los cambios a nivel transcripcional en los genes monitoreados fueron tiempo- y concentración-dependiente.
- La exposición de *C. gigas* a las células tóxicas de *G. catenatum* provocó un aumento en el nivel de transcripción de genes que codifican proteínas implicadas en respuesta a estrés, antioxidante, detoxificación e inmune (respuesta aguda), con un incremento mayor a mediano plazo (respuesta subcrónica).
- El incremento en el nivel de expresión del gen *cyp356A1* en fase subcrónica, indica su posible participación en los procesos de eliminación de las toxinas PST en juveniles de *C. gigas* de 3 ± 1 mm.
- Se observó una alta modulación de la transcripción en genes involucrados en la regulación del ciclo celular, reparación del ADN dañado y la muerte celular programada como: *p21*, *cafP55*, *p53*, *ef2*, *casp1* principalmente bajo exposición

subcrónica; esto podría implicar que el dinoflagelado o sus toxinas tienen algún tipo de efecto genotóxico.

- La identificación y selección de los genes de referencia es un paso crucial para llevar a cabo los análisis de expresión génica a nivel transcripcional: 1) los genes más estables en los ostiones de talla pequeña fueron: *gapdh* y *28s ARNr*; 2) los genes más estables en análisis tejido-específico fueron: *gapdh*, *ef-1 α* y *tub β* para glándula digestiva y *gapdh*, *ef-1 α* y *28s ARNr* en hemocitos.
- En la glándula digestiva de los ostiones de 50 ± 10 mm se identificó una marcada desregulación en el nivel transcripcional de *p21*, *p53*, *caf p55* y *ef2*, principalmente en los organismos alimentados sólo con *G. catenatum* (control tóxico).
- El incremento en la expresión de *casp1* indica que un daño tisular está en curso, desencadenando procesos inflamatorios en los organismos expuestos a *G. catenatum*.
- La modificación de la tasa de transcripción de *act* en la glándula digestiva hace evidente una desregulación severa y por lo tanto, desestabilidad en el citoesqueleto que puede conducir a una pérdida de la integridad celular.
- En hemocitos, la marcada modulación de los genes de respuesta inmune: *cvt*, *lgbp*, *if 44* y *hsp70* indica que *G. catenatum* es reconocido como un agente extraño, que promueve la activación de una respuesta de defensa inmediata en *C. gigas*.
- Los análisis histológicos realizados en los ostiones expuestos a *G. catenatum* mostraron un daño importante en los tejidos, principalmente en la glándula digestiva (aplanamiento celular, inflamación, ruptura, exfoliación, y metaplasia), intestino (diapédesis de hemocitos), branquia (alteración de los filamentos branquiales, fusión y pérdida de la ciliatura) músculo (edema, pérdida de masa muscular); el

daño observado mostro una relacion directa con la dosis del dinoflagelado y si este fue proporcionado en dieta simple o mixta.

- Se confirma la hipótesis planteada al encontrar que los patrones de expresión génica fueron diferenciales dependiendo del tipo de exposición aguda o subcrónica de *C. gigas* al estar expuesto a las células tóxicas durante las primeras horas, activa la primera línea de defensa al estrés mediada por la expresión de glutamina sintetasa (gs), proteína de shock térmico (hsp70), superóxido dismutasa (sod-cu/zn), glutatión s transferasa (gst-s) y del sistema inmune. En una etapa tardía, la mayor respuesta se encontró en los genes involucrados en la regulación del ciclo celular, citoesqueleto, inflamación, detoxificación (*cyp356A1*).
- El presente trabajo contribuye a entender un poco los mecanismos moleculares principalmente, los genes que son modificados en su nivel de expresión, ante las condiciones probadas. Sin embargo, sería importante realizar estudios más detallados que involucren otras técnicas como microarreglos o secuenciación masiva, para buscar genes que puedan utilizarse como marcadores específicos para evaluar el daño a la exposición al dinoflagelado tóxico.
- Se observó que si el ostión del Pacífico es expuesto a células solas de *G. catenatum*, el cambio en el nivel de expresión de los genes estudiados fue mayor en comparación con las dietas mixtas. Sin embargo, en condiciones naturales, cuando se presentan eventos FAN, estos no son unialgales. Por tanto, este tipo de dietas, así como la exposición a los extractos puros de las toxinas, no serían una respuesta comparable con lo que sucede en el ambiente cuando aparecen dichos eventos.
- Los ostiones juveniles de talla pequeña fueron los más afectados a la exposición del dinoflagelado tóxico, aunque no se utilizaron las mismas concentraciones del

dinoflagelado en las 2 tallas, se pudo observar que con concentraciones de 3×10^3 cel mL⁻¹ de *G. catenatum* a los 7 días de exposición, se encontró una mayor modulación en todos los genes, comparados con los juveniles de mayor talla con una densidad mayor (6×10^3 cel mL⁻¹).

10. REFERENCIAS

- Allam, B. y C. Paillard. 1998. Defense factors in clam extrapallial fluids. *Dis. Aquat. Org.* 33: 123–128.
- Almond, J.B. y M. Cohen. 2002. The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia* 16 (4): 433–43.
- Andersen, C.L., J.L. Jensen y F.T. Orntoft. 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer research* 64: 5245-5250.
- Aune, T. 2001. Risk assessment of toxins associated with DSP, PSP and ASP in seafood. *In* De Koe, W.J., Samson, R.A., Van Egmond, H.P., Gilbert, J. & M. Sabino, eds. *Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millennium. Proceedings of the X International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins* (May 2000, Guarujá, Brazil), pp. 515-526. Wageningen, the Netherlands, Ponsen & Looyen.
- Band-Schmidt C., J.J. Bustillo-Guzmán, I. Gárate-Lizárraga, C.H. Lechuga-Devéze, K. Reinhart, B. Luckas. 2005. Paralytic shellfish toxin profile in strains of dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham and the Scallop *Argopecten ventricosus* G-B. Sowerby II from Bahía Concepción. Gulf of California. México *Harmful Algae*. 4: 21-31.
- Band-Schmidt, C.J., J.J. Bustillos-Guzmán, J.D. López-Cortés, I. Gárate-Lizárraga, J.E. Núñez-Vázquez. 2010. Ecological and physiological studies of *Gymnodinium catenatum* in the Mexican Pacific: a review. *Marine drugs* 8: 1935–1961.
- Bardouil, M., M. Bohec, M. Cormerais, S. Bougrier, P. Lassus. 1993. Experimental study of the effects of a toxic microalgal diet on feeding of the oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *J Shellfish Res.* 12: 417–422.
- Bardouil, M., M. Bohec, M. Cormerais, S. Bougrier, P. Lassus. 1996. Experimental study of the effects of a toxic microalgal diet on feeding of the oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *J. Shellfish Res.* 12: 417–422.
- Bao, Y.B., L. Li L, X.M. Ye, H.Y. Dong, X.W. Jin, H.Z. Lin. 2013. Expression of glutamine synthetase in *Tegillarca granosa* (Bivalvia, Arcidae) hemocytes stimulated by *Vibrio parahaemolyticus* and Lipopolysaccharides. *Genetics and Molecular Research* 12 (2): 1143-1154
- Bayne, J.C., P.M. Buckley, P.C. DeWan. 1980. *Schistosoma mansoni*: Cytotoxicity of hemocytes from susceptible snail hosts for sporocysts in plasma from resistant *Biomphalaria glabrata*. *Exp Parasitol.* 50 (3): 409-416

- Blanco J., I.M. Reyero, M.J. Franco I.M. Reyero, A. Moroño. 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.
- Blanco J., I.M. Reyero, M.J. Franco. 2003. Kinetics of accumulation and transformation of paralytic shellfish toxins in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon* 42: 777-784.
- Böttger, S., E. Jerszyk, B. Low, C. Walker. 2008. Genotoxic stress-induced expression of p53 and apoptosis in leukemic clam hemocytes with cytoplasmically sequestered p53. *Cancer Research* 68: 777-82.
- Bougrier, S., A.J.S. Hawkins, Héral M. 1997. Preingestive selection of different microalgal mixtures in *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis*, analysed by flow cytometry. *Aquaculture*. 150 (1-2): 123-124.
- Bougrier, S. 2003. Paralytic shellfish poison accumulation yields and feeding time activity in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and king scallop (*Pecten maximus*). *Aquatic Living Resources*, 16(4): 347-352.
- Boutet, I., A. Tanguy, M. Auffret, N. Mujdzic, D. Moraga. 2003b. Expresión of Hsp 70 in experimentally metal exposed European flat oyster *Ostrea edulis*. 22(3): 763-766.
- Boutet I, A. Tanguy, D. Moraga. 2004. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene* 329: 147-157.
- Bricelj, V.M. y S.E. Shumway. 1998. Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics and biotransformation. *Rev. Fish. Sci.* 6: 315-383.
- Bricelj, V.M., L. Connell L, K. Konoki, P.S. Macquarrie, T. Scheuer, A.W. Catterall, L.V. Trainer. 2005. Sodium channel mutation leading to saxitoxin resistance in clams increase risk of PSP. *Nature* 434: 763-767.
- Buggr, D. M., H. Hegaret, G. H. Wikfors, B. Allam. 2007. Oxidative burst in hard clam (*Mercenaria mercenaria*) hemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 23: 188-196.
- Burgess, V. y G. Shaw. 2001. Pectenotoxins – an issue for public health. A review of their comparative toxicology and metabolism. *Environment International* 27: 275-283.
- Bustin S.A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR. (RT-PCR) trends and problems. *J. Mol. Endocrinol*, 29:23-39.
- Carsten C y M.P. Mattson. 2005. p53 inneuronal apoptosis. *Biochem and Biophys Res Commun.* 331 (3): 761-777.

- Cáceres-Martínez, J. y R. Vásquez-Yeomans. 2013. Enfermedades, parásitos y episodios de mortalidad de ostiones de importancia comercial en México y sus implicaciones para la producción Ciencia Pesquera. 21: 5-48
- Cellura, C., M. Toubiana, N. Parrinello, P. Roch. 2007. Specific expression of antimicrobial peptide and HSP70 genes in response to heat-shock and several bacterial challenges in mussels. Fish Shellfish Immunol. 22 (4): 340–350.
- Collin H, A.L. Meistertzheim, D. Moraga, I. Boutet. 2010. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793), to pesticide exposure under experimental conditions. J Exp Biol 213: 4010–4017.
- Cortés-Altamirano, R. 1998b. *Las mareas Rojas*. AGT, Editor, S.A. México, D.F.: 161 pp.
- Coughlan J. 1969. The estimation of filtering rate from the clearance of suspensions. Marine Biology. 2: 356-358.
- Chao, C., S. Saito, J. Kang, W.C. Anderson, E. Appella Y. Xu. 2000. p53 transcriptional activity is essential for p53-dependent apoptosis following DNA damage. The EMBO J. 19 (18): 4967-4975.
- Choi, M. C., H.P.D. Hsieh, S.K.P. Lam, W.X. Wang. 2003. Field depuration and biotransformation of paralytic shellfish toxins in scallop *Chlamys nobilis* and green-lipped mussel *Perna viridis*. Marine Biology, 143(5): 927-934.
- Denslow N., N. Garcia-Reyero, y D.S. Barberc. 2007. Fish 'n' chips: the use of microarrays for aquatic toxicology. 3(3): 172–177.
- Estrada, N., M.D. Jesús, A. Campa-córdova, A. Luna. 2007. 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.
- Fabbri E., P. Valbonesi P., S. Franzellitti. 2008. HSP expression in bivalves. ISJ 5: 135-161.
- FAO, 2005. Estudio de alimentación y nutrición sobre Biotoxinas Marinas: intoxicación paralítica por mariscos (PSP) FAO, Fisheries Information, Data and Statistics Unit. Rome. 5-49 pp.
- FAO. 2006. Cultured Aquatic Species Information Programme – *Crassostrea gigas*. Text by Helm, M. M. FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome.
- Farcy, E., C. Fleury, C. Lelong, P.M. Dubos, C. Voiseux, B. Fievet, M.J. Lebel. 2008b. Molecular cloning of a new member of the p53 family from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and seasonal pattern of its transcriptional expression level. Marine Environmental Research 66: 300–308.

- Feder, M.E. y G.E. Hofmann 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61: 243–282.
- Fernández-Reiriz, M.J., M.J. Navarro, A.M. Contreras, U. Labarta. 2008. Trophic interactions between the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* and *Mytilus chilensis*: feeding and digestive behaviour to long-term exposure. *Aquatic Toxicology*. 87: 245–251.
- Ford, S.E., M.V. Bricelj, C. Lambert, C. Paillard. 2008. Deleterious effects of a nonPST bioactive compound(s) from *Alexandrium tamarense* on bivalve hemocytes. *Mar. Biol.* 154: 241–253.
- Franchini, A., A. Milandri, R. Poletti, E. Ottaviani. 2003. Immunolocalization of yessotoxins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon*. 41 (8): 967-970.
- Gainey, L.F. y S.E. Shumway. 1988. A compendium of the responses of bivalve mollusks to toxic dinoflagellates. *Journal of Shellfish Research* 7: 623–628.
- Galimany, E., I. Sunila, I. Hegaret, G. Wikfors, M. Ramon. 2008. Pathology and immune response of the blue mussel (*Mytilus edulis L.*) after an exposure to the harmful dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Harmful Algae* 7: 630–638.
- Gestal, C., M.M. Costa, B. Novoa, A. Figueras. 2007 Analysis of differentially expressed genes in response to bacterial stimulation in hemocytes of the carpet –shell clam *Ruditapes decussatus*: identification of new antimicrobial peptides. *Gene*. 406 (1-2): 134-143.
- Gifford DJ, A.D. Caron. 2000. Sampling, preservation, enumeration and biomass of marine protozooplankton. In: Harris RP et al. (Eds) ICES Zooplankton methodology manual. Academic Press, London. pp. 193-221.
- Girón-Pérez MI. 2010. Relationships between innate immunity in bivalve mollusks and environmental pollution. *ISJ* 7: 149–156.
- González-Romero, R., C. Rivera-Casas, J. Fernández-Tajes, J. Ausió, J. Méndez, M.J. Eirín-López. 2012. Chromatin specialization in bivalve molluscs: A leap forward for the evaluation of okadaic acid genotoxicity in the marine environment. *Comparative Biochem. and Phys. part C* 155: 175–181.
- Gosling E. 2003. *Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture*. Wiley-Blackwell. 456 p.
- Green, T. J., J.T. Dixon, E. Devic, A.D. Adlard, C.A. Barnes. 2009. Differential expression of genes encoding anti-oxidant enzymes in Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata* (Gould) selected for disease resistance. *Fish Shellfish Immunol.* 26: 799-810.

- Gruenheid, S. y B.B. Finlay. 2003. Microbial pathogenesis and cytoskeletal function. *Nature* 422 (6933): 775–781.
- Guillard, R.L.L. y H. Ryther. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In Smith, W.L. and M.M., Chalg, (Eds) *Culture of marine invertebrate animals*, Plenum Press, New York. pp. 29-60.
- Haberkorn H., C. Lambert., N. Le Goïca., M. Guéguen., M. Moal., E. Palacios., P. Lassus., P. Soudanta. 2010a. Effects of *Alexandrium minutum* exposure upon physiological and hematological variables of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*. *Aquatic Toxicology*. 97: 96–108.
- Haberkorn, H, C. Lambert, N.C. Le goi, J. Moal, M. Suquet, M. Guegen, I. Sunila, P. Soudat. 2010b. Effects of *Alexandrium minutum* exposure on nutrition-related processes and reproductive output in oysters *Crassostrea gigas*. *Harmful Algae*, 9: 427–439.
- Hallegraeff, G.M. 1995 Harmful algal blooms: a global overview, In: *Manual on Harmful Marine Microalgae* (ed. by G.M. Hallegraeff, D.M. Anderson & A.D. Cembella), pp. 1-22 IOC Manuals and Guides, UNESCO. 33.
- Hallen, L., Y. Burki, M. Ebeling, C. Broger, F. Siegrist, K. Oroszlan-Szovik, B. Bohrmann, U. Certa, and S. Foser. 2007. Antiproliferative activity of the human IFN- α -inducible protein IFI44. *J. of Interferon & Cytokine Res.* 27: 675-680.
- Hartl, U.F. 1996. Molecular chaperones in celular protein folding. *Nature*. 381: 571-580
- Hégaret, H. y G. Wikfors. 2005. Time-dependent changes in hemocytes of eastern oysters *Crassostrea virginica* and northern bay scallops *Argopecten irradians irradians*, exposed to a cultured strain of *Prorocentrum minimum*. *Harmful Algae* 4 (2): 187-199.
- Hégaret, H., G. Wikfors, P. Soudant, C. Lambert., J.B. Bérard. 2007a. Minimal apparent effect on oyster hemocytes, *Aquat. Living Resour.* 152: 441-447.
- Hégaret, H., G. Wikfors, S. Shumway. 2007. Diverse feeding responses of five species of bivalve mollusk when exposed to three species of harmful algae. *Journal of Shellfish Research* 26, 549-559.
- Hégaret, H., G. Wikfors, S. Shumway. 2009. Biotoxin contamination and shellfish safety, In: *Shellfish Quality and Safety* (ed. by Shumway, S.E. & G.E. Rodrick). Woodhead Publishing Cambridge, pp. 43-80.
- Hégaret, H., K.B. Brokordt., C.F. Gaymer., K.B. Lohrmann., C. García., D. Varela. 2012. Effects of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* on histopathological and escape responses of the Northern scallop *Argopecten purpuratus*. *Harmful Algae* 18, 74–83.

- Helm, M.M., N. Bourne., A. Lovatelli. 2006. Hatchery culture of bivalves. A practical manual. FAO Fisheries Technical Paper, pp.177.
- Howard, D.W. y C.S. Smith. 1983. Histological techniques for marine bivalve mollusks. *National Oceanic and Atmospheric Administration*. Technical Memorandum NMFSF/ NEC-25. U.S. Department of Commerce, pp 95.
- Huvet A., A. Herpin., L. Degremont., Y. Labreuche., J.F. Samain., C. Cunningham. 2004. The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene*. 343, 211–220.
- Jenny M.J., A.H. Ringwood., E.R. Lacy., A.J. Lewitus., J.W. Kempton., P.S. Gross., G.W. Warr., R.W. Chapman. 2002. Potential indicators of stress response identified by expressed sequence tag analysis of hemocytes and embryos from the American Oyster, *Crassostrea virginica*. *Mar. Biotechnol.* 4: 81-93.
- Keppler, C.J. 2007. Effects of Ammonia on Cellular Biomarker Responses in Oysters *Crassostrea virginica*. *Ecological Engineering* 63-66.
- Kitamura, A., K. Takahashi., A. Okajima., N. Kitamura. 1994. Induction of the human gene for p44, a hepatitis C-associated microtubular aggregate protein, by interferon- α/β . *Eur. J. Biochem.* 224: 877-883.
- Kodama, M. 2010. Paralytic Shellfish Poisoning Toxins: Biochemistry and Origin. *ABSM* 3: 1–38.
- Laabir, M., Z. Amzil., P. Lassus., E. Masseret., Y. Tapilatu., R. Vargas., D. Grzebyk. 2007. Viability , growth and toxicity of *Alexandrium catenella* and *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) following ingestion and gut passage in the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquatic Living Resources* 57: 51–57.
- Lacoste A., F. Jalabert., S. Malham., A. Cueff., F. Gelebart., C. Cordevant., M. Lange., S.A. Poulay. 2001. A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortalities of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix. *Diseases of Aquatic Organisms* 46: 139-145.
- Landsberg, J.H. 2002. The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. *Reviews in Fisheries Science* 10: 113–390.
- Lassus P., M. Bardouil, P. Masselin, M. Naviner, P. Truquet. 2000. Comparative efficiencies of different non-toxic microalgal diets in detoxification of PSP-contaminated oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg). *J. Nat. Toxins* 9(1): 1-12.

- Lassus, P., R. Baron., P. Garen., P. Truquet., P. Masselin., M. Bardouil., D. Leguay., Z. Amzil. 2004. Paralytic shellfish poison outbreaks in the Penzé estuary: Environmental factors affecting toxin uptake in the oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquatic Living Resources* 214: 207–214.
- Lechuga-Devéze, C.H. y M.L. Morquecho-Escamilla. 1998. Early spring potentially harmful phytoplankton in Bahía Concepción, Gulf of California. *Bull. Mar. Sci.* 63(3): 503-512.
- Lefebvre, K.A., S.C. Tilton., T.K. Bammler., R.P. Beyer., S. Srinouanprachan., P.L. Stapleton. 2009. Gene Expression Profiles in Zebrafish Brain after Acute Exposure to Domoic Acid at Symptomatic and Asymptomatic Doses. *System.* 107(1): 65-77.
- Lesser, P.M. 2006. Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and Physiological Ecology. *Annual Review of Physiology* 68: 253–78.
- Llewellyn L.E., 2006. Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors. *Natural Products Reports* 23(2): 200-22.
- Lindhal, O. 1998. Occurrence and monitoring of harmful algae in the marine environment, 409 –423. En: Miraglia M., H. Van Egmond, C. Brera & J. Gilberts (Eds.). *Micotoxins and phycotoxins developments in chemistry, toxicology and food safety. Proceedings of the IX International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins*, pp. 409-423.
- Livak, K.J. y T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25 (4): 402–408.
- Manduzio, H., B. Rocher., F. Durand., C. Galap., F. Leboulenger. 2005. The point about oxidative stress in mollusks. *Review. ISJ* 2: 91-104.
- Martoja, R., M. Martoja-Pierson., P.P. Grassé., 1967. *Initiation aux techniques de l'histologie animale*. Paris, Masson. pp. 345.
- Mat, M.A., H. Haberkorn., P.J. Bourdineaud., J.C. Massabuau., D. Tran. 2013. Genetic and genotoxic impacts in the oyster *Crassostrea gigas* exposed to the harmful alga *Alexandrium minutum*. *Aquatic Toxicology* 458–465.
- Matus, M. 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. México.p106.
- Medeiros D.I., N.M. Siebert, G. Toledo-silva, O.M. Moraes, F.M.R. Marques, D.A.C. Bairy. 2008. Differential gene expression in oyster exposed to sewage. *Mar. Environmental. Research.* 66 (1): 156-157.

- Mirzayans, R., B. Andrais, A. Scott, D. Murray. 2012. New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: Implications for cancer therapy. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 1-16.
- Mons, M.N., H.P. Van Egmond, G.J.A. Speijers. 1998. Paralytic shellfish poisoning: A review. RIVM Report 388802 005. June 1998.
- Navarro, J.M., A.M. Contreras. 2010. An integrative response by *Mytilus chilensis* to the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Marine Biology* 157: 1967–1974.
- Núñez-Acuña, G., A.E. Aballay, H. Hégaret, P.A. Astuya, C. Gallardo-Escárate. 2013. Transcriptional responses of *Mytilus chilensis* exposed *in vivo* to saxitoxin (STX) *Journal of Molluscan Studies* 79 (4): 323-331.
- Ochoa, J.L., A. Sánchez-Paz., A. Cruz-Villacorta., E. Nunez-Vázquez., A. Sierra-Beltrán. 1997. Toxic events in the northwest Pacific coastline of Mexico during 1992-1995: origin and impact. *Hydrobiologia* 352: 195-200.
- Pérez-Linares J, J.L. Ochoa, A. Gago-Martínez. 2008. Effect of PSP toxins in white leg shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931. *JFS* 73: 69–73.
- Pérez-Linares J, J.L. Ochoa, A. Gago-Martínez. 2009. 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.
- Persson, A., B.C. Smith, G.H. Wikfors, M. Quilliam. 2006. Grazing on toxic *Alexandrium fundyense* resting cysts and vegetative cells by the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Harmful Algae* 5: 678–684.
- Pfaffl, M.W., A. Tichopad, C. Prgomet, T.P. Neuvians. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology letters* 26: 509-515.
- Renault T., N. Faury, V. Barbosa-Solomieu, K. Moreau. 2011. Suppression subtractive hybridisation (SSH) and real time PCR reveal differential gene expression in the Pacific cupped oyster, *Crassostrea gigas*, challenged with Ostreid herpesvirus. *Developmental & Comparative Immunology* 35 (7): 725-735.
- Romero-Geraldo R.J. y N.Y. Hernández-Saavedra. 2012. Stress gene expression in *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) in response to experimental exposure to the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge, 1975. *Aquac Res* 1–11.
- Saavedra, C. y E. Bachére. 2006. Bivalve Genomics. *Aquaculture*. 256: 1-14.
- Santoro M.G. 2000. Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochemical pharmacology* 59 (1): 55–63.

- Salierno, J.D., N.S. Snyder, A.Z. Murphy, M. Poli, S. Hall, D. Baden. 2006. Harmful algal bloom toxins alter c-Fos protein expression in the brain of killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Aquatic toxicology* 78(4): 350-357.
- Scotti D.P., C.D. Sally, D.R. Greenwood. 2007. Characterisation of cavortin, the major haemolymph protein of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) , New Zealand. *Journal of Marine and Freshwater Research* 41: 1 91-101
- Shumway, S.E. 1990. A review of the effects of algal blooms on shellfish and aquaculture. *Journal World Aquaculture Society* 2: 65–104.
- Shumway S.E. 1991. *Scallops: biology, ecology and aquaculture*. Elsevier Science Publishers B.V. New York, USA. 1095 pp.
- Sierra-Beltrán, A.P., A. Cruz-Villacorta, E. Núñez-Vázquez, L.M. Del Villar, J. Crerecero, J.L. Ochoa. 1998. An overview of the marine food poisoning in Mexico. *Toxicon* 35: 447-453.
- Siu-Chung L., W. Wen-Xiong, D. Hsieh_2001. Feeding and absorption of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* by two marine bivalves from the South China Sea. *Marine Biology*. 139 (4): 617-624.
- Song, L., L. Wu, D. Ni, Y. Chang, W. Xu, K. Xing. 2006. The cDNA cloning and mRNA expression of heat shock protein 70 gene in the haemocytes of bay scallop (*Argopecten irradians*, Lamarck 1819) responding to bacteria challenge and naphthalin stress. *Fish Shellfish Immunol.* 21: 335–345.
- Sunila, I. y J. Labanca, 2003. Apoptosis in the pathogenesis of infectious diseases in the eastern oyster *Crassostreavirginica*. *Dis. Aquat. Org.* 56: 163-170.
- Snyder, R.V., P.D.L. Gibbs, A. Palacios, L. Abiy, R. Dickey, J.V. Lopez. 2003. Polyketide synthase genes from marine dinoflagellates. *Marine biotechnology* 5(1): 1-12.
- Vrolijk, N.H. y M.N. Targett .1992. Biotransformation enzymes in *Cyphomagibbsum* (Gastropoda: Ovilidae): implications for detoxification og gorgonian allelochemicals. *Mar Environ Res.* 88: 237-246.
- Tanguy, A., X. Guo., S.E. Ford. 2004. Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*C. gigas*) oysters. *Gene* 338: 121-131.
- Tanguy A., I. Boutet, D. Moraga. 2005. Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to pesticides exposure. *FEBS J.* 272: 390–403.
- Taylor-Harding, B., U.K. Binné, M. Korenjak, A. Brehm, N.J. Dyson. 2004. *Mol. Cell. Biol.* 24(20): 9124-36

- Toledo-Silva G., N.M. Siebert, D.I. Medeiros, T.C.M. Sincero, O.M. Moraes, J.V. Goldstone, D.A.C. Bainy. 2008. Cloning a new cytochrome P450 isoform (CYP356A1) from oyster *Crassostrea gigas*. Mar. Environmental. Research. 66 (1): 15_18
- Tomanek, L. 2011. Environmental Proteomics: Changes in the Proteome of Marine Organisms in Response to Environmental Stress, Pollutants, Infection, Symbiosis, and Development. Annual Review of Marine Science, 3(1): 373-399.
- Tyler, J.K., M. Bulger, T.R. Kamakaka, R. Kobayashi. 1996. The p55 subunit of Drosophila chromatin assembly factor 1 is homologous to a histone deacetylase-associated protein. Mol. Cell. Biol. 16(11): 6149.
- Vandesompele, J., K. De Preter., F. Pattyn., B. Poppe., N. Van Roy. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biology 3: 1–12.
- Vargas-Albores, F. y M.A. Barracco. 2001. Mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos, con énfasis en pectínidos. En: Los moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura (Maeda-Martínez, A. N., ed.) pp. 127-146. Editorial Limusa, México, D. F.
- Vasconcelos, V., J. Azevedo, M. Silva, V. Ramos. 2010. Effects of marine toxins on the reproduction and early stages development of aquatic organisms. Marine Drugs. 8: 59-79.
- Wikfors, G.H. 2005. A review and new analysis of trophic interactions between *Prorocentrum minimum* and clams, scallops and oysters. Harmful Algae 4: 585-592.
- Wildish, D., P. Lassus, J. Martin, A. Saulnier, M. Bardouil. 1998. Effect of the PSP causing dinoflagellate, *Alexandrium* spp. on the initial feeding response of *Crassostrea gigas*. Aquatic Living Resources 11: 35-43.
- Whalen EK, D. Morin D, C.Y. Lin, R.S. Tjeerdema, J.V. Goldstone. 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.
- Zhang, G., X.Fang, X. Guo, L. Li, R. Luo, F. Xu, P. Yang. 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. Nature 490: 49–54.

11. ANEXOS

ANEXO I

Resultados de los análisis preliminares que se realizaron para comprobar, eficiencia de la síntesis de ADNc, especificidad de los oligonucleótidos, tiempos de exposición y concentración celular con mayor efecto.

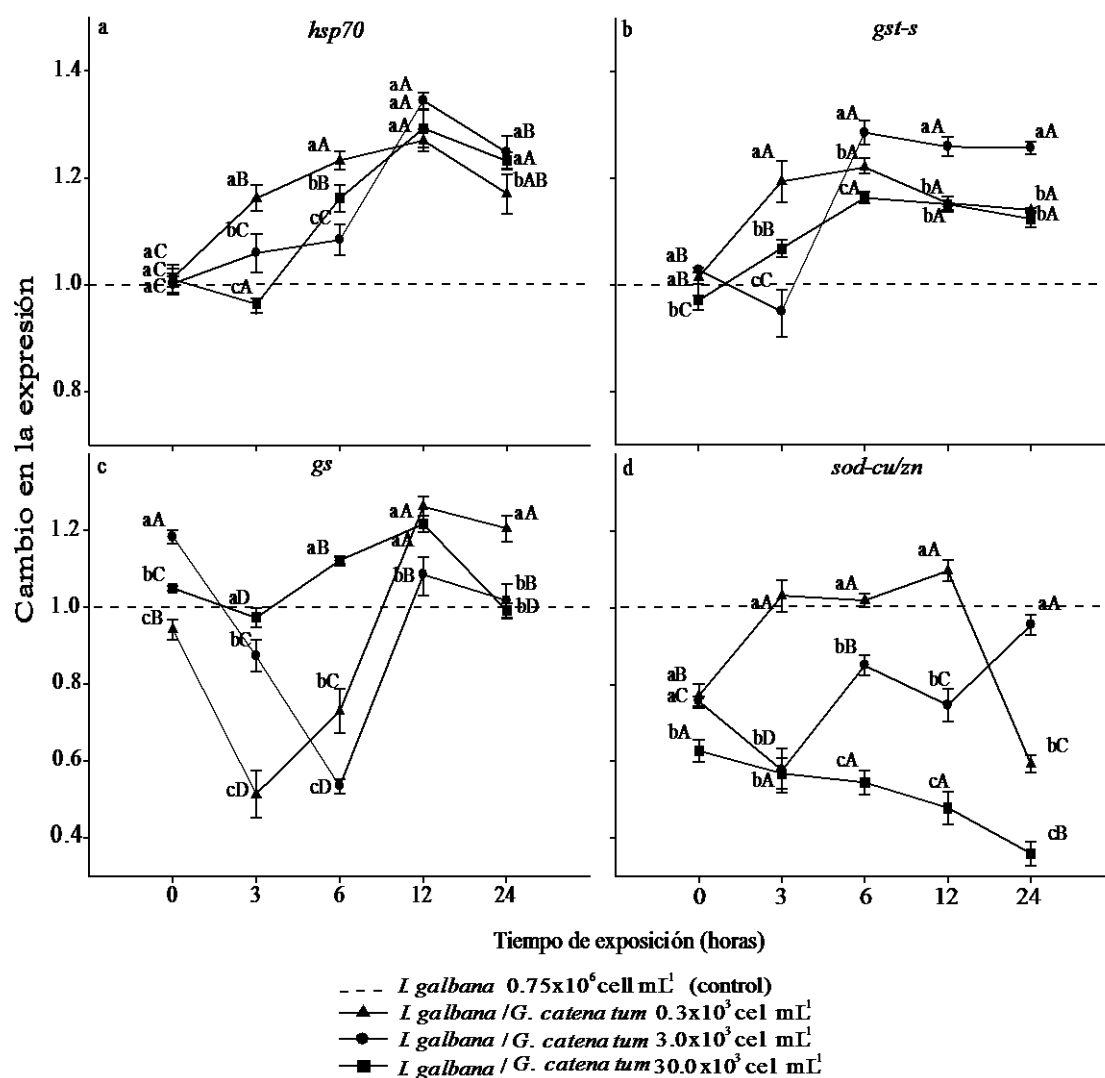


Figura 26. Expresión semicuantitativa (RT-PCR punto final) de genes involucrados en procesos de estrés y antioxidante en *C. gigas* expuesto a células de *G. catenatum* y células de *I. galbana* (control no tóxico). Las letras mayúsculas significan diferencias significativas dentro de un tratamiento en un tiempo determinado, las letras minúsculas indican las diferencias significativas dentro de los tratamientos y el control no tóxico.

ANEXO II

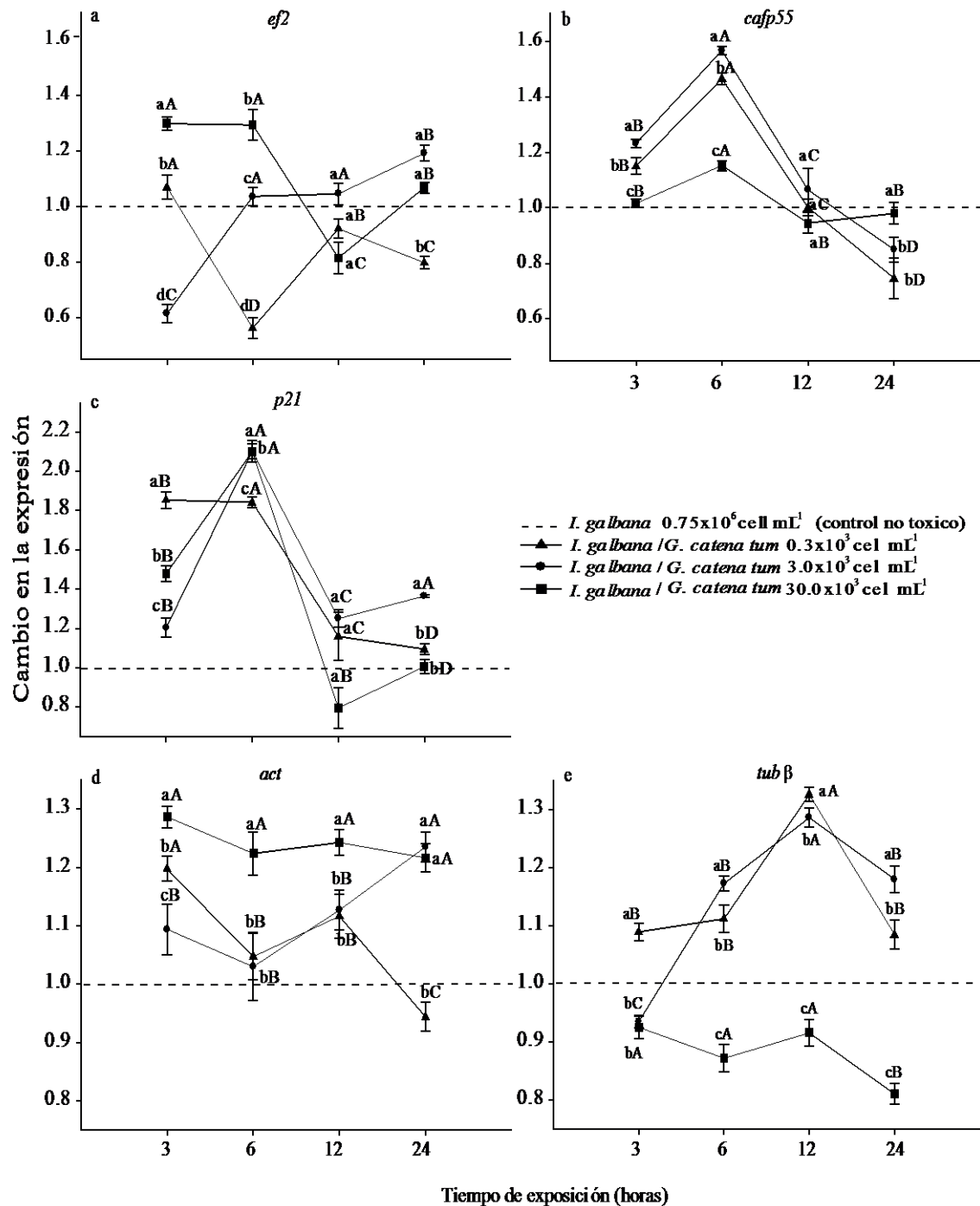


Figura 27. Expresión semicuantitativa (RT-PCR punto final) de genes involucrados en la regulación del ciclo celular y citoesqueleto en *C. gigas* expuesto a células de *G. catenatum* y células de *I. galbana* (control no tóxico). Las letras mayúsculas significan diferencias significativas dentro de un tratamiento en un tiempo determinado, las letras minúsculas indican las diferencias significativas dentro de los tratamientos y el control no tóxico.

Genomics Study of the Exposure Effect of *Gymnodinium catenatum*, a Paralyzing Toxin Producer, on *Crassostrea gigas*' Defense System and Detoxification Genes

Norma García-Lagunas¹, Reyna Romero-Geraldo^{1,2}, Norma Y. Hernández-Saavedra^{1*}

¹ Laboratorio de Genética Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), La Paz, Baja California Sur, México, ² Instituto Tecnológico de La Paz, La Paz, Baja California Sur, México

Abstract

Background: *Crassostrea gigas* accumulates paralytic shellfish toxins (PST) associated with red tide species as *Gymnodinium catenatum*. Previous studies demonstrated bivalves show variable feeding responses to toxic algae at physiological level; recently, only one study has reported biochemical changes in the transcript level of the genes involved in *C. gigas* stress response.

Principal Findings: We found that 24 h feeding on toxic dinoflagellate cells (acute exposure) induced a significant decrease in clearance rate and expression level changes of the genes involved in antioxidant defense (copper/zinc superoxide dismutase, Cu/Zn-SOD), cell detoxification (glutathione S-transferase, GST and cytochrome P450, CPY450), intermediate immune response activation (lipopolysaccharide and beta glucan binding protein, LGBP), and stress responses (glutamine synthetase, GS) in Pacific oysters compared to the effects with the non-toxic microalga *Isochrysis galbana*. A sub-chronic exposure feeding on toxic dinoflagellate cells for seven and fourteen days (30×10^3 cells mL⁻¹) showed higher gene expression levels. A significant increase was observed in Cu/Zn-SOD, GST, and LGBP at day 7 and a major increase in GS and CPY450 at day 14. We also observed that oysters fed only with *G. catenatum* (3×10^3 cells mL⁻¹) produced a significant increase on the transcription level than in a mixed diet (3×10^3 cells mL⁻¹ of *G. catenatum*+ 0.75×10^6 cells mL⁻¹ *I. galbana*) in all the analyzed genes.

Conclusions: Our results provide gene expression data of PST producer dinoflagellate *G. catenatum* toxic effects on *C. gigas*, a commercially important bivalve. Over expressed genes indicate the activation of a potent protective mechanism, whose response depends on both cell concentration and exposure time against these toxic microalgae. Given the importance of dinoflagellate blooms in coastal environments, these results provide a more comprehensive overview of how oysters respond to stress generated by toxic dinoflagellate exposure.

Citation: García-Lagunas N, Romero-Geraldo R, Hernández-Saavedra NY (2013) Genomics Study of the Exposure Effect of *Gymnodinium catenatum*, a Paralyzing Toxin Producer, on *Crassostrea gigas*' Defense System and Detoxification Genes. PLoS ONE 8(9): e72323. doi:10.1371/journal.pone.0072323

Editor: Alfredo Herrera-Estrella, Cinvestav, Mexico

Received: March 11, 2013; **Accepted:** July 10, 2013; **Published:** September 10, 2013

Copyright: © 2013 García-Lagunas et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by CONACyT for scholarship (#083442), funding project CONACyT CB07 083442. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: nhernan04@cibnor.mx

Introduction

Marine bivalves accumulate toxins during harmful algal bloom events (HABs), acting as principal vectors posing a health hazard to humans who consume them [1,2]. The Pacific oyster *Crassostrea gigas* may accumulate paralytic shellfish toxins (PSTs), a class of well-known neurotoxins closely associated with HABs, which may be highly toxic and are present over wide coastal areas [2–6].

Paralytic shellfish toxins consist of more than 20 structurally related derivatives with dissimilar toxic potencies. Saxitoxin (STX) is the representative compound that has a tricyclic guanidine linked to a hydromethyluracil group [2,3]. PSTs exert their effect by binding reversibly to voltage-sensitive sodium channels on excitable cell membranes and blocking neurotransmission [1,3]; *Alexandrium*, *Pyrodinium*, and *Gymnodinium* genera are the dominant sources of marine PSTs [7]. Consequently,

bivalves' feeding physiology in the presence of toxic dinoflagellates is an important research topic especially on areas where HABs frequently occur. Previous studies show that bivalves have variable feeding responses to toxic algae, which may be related to their HAB exposure history [1,6,7], toxin bioaccumulation [1,3,6], dinoflagellate toxicity [6,8], exposure time, and bivalve mollusk species [1,6,9].

Several bivalve behavioral, physiological, and cell responses to harmful algae have already been described, such as filtration activity reduction [1,9], pseudo-feces production [9,10], metabolic rate increase [11], reproductive development anomalies [12], and oxygen consumption changes [13]. Immune system alteration has been reported by phagocytic capacity inhibition and hemocyte adhesion [14–16]. Effects of *Alexandrium minutum* exposure caused generalized tissue inflammation, principally of digestive organs, and biochemical alterations, such as amylase activity changes, reactive oxygen species production, and phenol oxidase activities

[15]. However, few studies have addressed gene expression changes in *C. gigas* in response to toxic algal exposure or to their toxins. These studies revealed high heat shock protein 70 (Hsp70), cytochrome P450 isoform 356A1 (CYP356A1), and fatty acid binding protein (FABP) expression levels on hemocytes exposed to brevetoxin (PbTx-2) [16]; also, other researchers have reported that level expression of the genes involved in antioxidant defense, detoxification, and stress response (GS, GST, Hsp70, and Cu/Zn-SOD) changed in response to *Prorocentrum lima* (diarrheal toxin producer, DSP) [17].

The aim of this study was to examine whether *C. gigas* exposure to the toxic dinoflagellate *G. catenatum* cells promotes changes in the transcript levels of some genes related to defense mechanisms, stress, and cell detoxification, and whether these changes are correlated with cell dose and/or exposure time. *C. gigas* was exposed to *G. catenatum* cells under experimental conditions: oysters were fed with the dinoflagellate, analyzed for acute (24 h) and sub-chronic (14 days) periods, and compared to those that received an innocuous microalga (*Isochrysis galbana*) as food; two dinoflagellate doses were tested: 3×10^3 and 30×10^3 cells mL⁻¹. Exposure to dinoflagellate PST-producers (*Alexandrium* and *Gymnodinium* genera) at a cell density from 10^4 to 10^5 cells L⁻¹ is reported as causative of toxic manifestations in wild mollusks [1,3,18].

Materials and Methods

Microalgal culture

The planktonic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* strain GCCV6, which produces paralyzing shellfish poisons (PSP) that include dc-saxitoxin (STX), gonyautoxins (GTX2,3), saxitoxin (STX), gonyautoxins (GTX1,4), and neo-saxitoxin (neo-STX), was obtained from the CIBNOR Collection of Marine Dinoflagellates; the strain produces between 25.7–101 pg STX_{eq} cell⁻¹ [19,20]. *G. catenatum* was grown in Fernbach flasks with modified f/2-medium [21]. Culture medium was prepared using seawater (35 psu), filtered with 0.45 μm membrane, and sterilized at 121°C, 15 lb for 20 min. Dinoflagellate cultures were maintained at 24°C±1°C, under light/dark and 150 μmol photons m⁻² s⁻¹ light intensity 12 h:12 h, and were harvested by centrifugation (2500 g 10 min⁻¹) during the late exponential growth phase (17–19 days after inoculation) [22] to obtain biomass for oyster assays. For the bioassays, cell density was adjusted using cell-counting data of each culture on Sedgwick-Rafter slides (Microscope Olympus BX41, Tokyo, Japan) after sample fixation with Lugol's solution [23].

Isochrysis galbana strain ISG-1, routinely used in aquaculture as food for bivalves [24], was provided by the Live Food Laboratory and used in our work as control diet. Cultures were grown in plastic bags with f/2-medium [21] and maintained at 20°C±1°C under constant illumination, 150 μmol photons m⁻² s⁻¹ light intensity.

Oysters

Diploid juvenile individuals of Pacific oysters (3 ± 1 mm, 0.022 ± 0.008 g) were obtained from the hatchery “Acuacultura Robles” at Las Botellas (Bahía Magdalena), Baja California Sur, Mexico. Organisms were divided into groups and kept in plastic aquariums (20 L) for acclimation in aerated filtered seawater (1 μm) at 21°C and 34 psu in the Wet Biological Safety Laboratory at CIBNOR for 10 days. The maintenance diet, according to the tables reported for the age [25], consisted of bacteria-free *I. galbana* (ISG-1) at 1.5×10^6 cells mL⁻¹, obtained from the Live Food Laboratory (CIBNOR).

Experimental design and sample collection

The test-dinoflagellate doses (concentrations) were based on field HAB observations of *G. catenatum* cells [18,22,26,27] and toxic-effect reports of PST producers (*Alexandrium* and *Gymnodinium* genera) [1,3,7,26,27].

Oysters were exposed to two *G. catenatum* (3 and 30×10^3 cell mL⁻¹) cell suspensions combined with a fixed amount of *I. galbana* (0.75×10^6 cell mL⁻¹). Control diet (toxin-negative) consisted only of *I. galbana* (0.75×10^6 cell mL⁻¹) to identify both normal oyster behavior and microalgal ingest. Also, another control (toxin-positive) was included consisting only of *G. catenatum* diet (3×10^3 cell mL⁻¹) to identify the single effect of the toxic dinoflagellate by ingestion and/or starvation. Groups of 25 oysters (in triplicate) were maintained in 100 mL transparent polypropylene containers with a 1:1 microalgal mixture in a final volume of 50 mL. Microalgal ration was provided each day as a single dose; aeration was used during feeding experiments to avoid cell sedimentation.

Five organisms of each experimental unit were randomly sampled after 6, 12, and 24 h (acute response) and 7–14 days (sub-chronic response). The sampled organisms corresponding to each sample time were replaced on each experimental unit by oysters exposed in the same experimental conditions (mirror exposure units used for replacement only). Samples were placed on Eppendorf® tubes, then washed with sterile seawater, and finally frozen at -80°C until use.

Clearance rate (CR)

Feeding rate (clearance rate, CR) was defined as the cleared water volume per unit time. In the bioassay, CR was measured by Coughlan's method [28]. Water-cell samples for cell counting were taken after 24 h of *G. catenatum* exposure, then fixed with Lugol's solution [23] and allowed to stand (at room temperature) for sedimentation and subsequent counting.

Total RNA preparation and first strand cDNA synthesis

Samples were thawed on ice and total RNA was extracted with TRIzol® Reagent manufacturers' protocol (Life Technologies, Carlsbad, California). Samples ($n = 5$) were homogenized using a glass pestle; later, two consecutive TRIzol® extractions were done at each sample. RNA quality was verified by visual inspection of 18S and 28S ribosomal RNA bands on agarose-TBE gels, as well as absence of visible genomic DNA contamination. Nucleic acid purity and concentration were determined by spectrophotometry Nanodrop 2000® (Thermo Scientific, Chicago, IL). To ensure complete DNA absence, a direct PCR was done with 1 μL of each RNA preparation using 28S ribosomal specific primers (Table 1) as a no-amplification control. Afterwards, from each verified RNA sample, 0.5 μg were used for cDNA synthesis using The SuperScript™ III First-Strand Synthesis System SuperMix® (Life Technologies, Carlsbad, California). Total RNA was reverse-transcribed by oligo-dT, and resulting cDNA was stored at -80°C until use.

Gene expression analysis by Quantitative real-time PCR (qPCR)

A set of five primer pairs was designed based on partial sequences reported for each evaluated gene (Table 1) sharing the following characteristics: primer length from 18 to 20 bp, T_m from 59°C to 61°C, and GC% from 40% to 60%; primer sequences and expected length of each amplicon. Prior to gene-expression quantification, efficiency of each primer pair was determined using the standard curve method [29]. Amplification efficiencies (E) for each primer (reference or target gene) were

Table 1. Primer details of target genes used on real-time PCR analysis and reference genes (*).

Genes	5'-3' primer sequence		Amplicon size (pb)	Primer efficiency	R ²	Genbank ref.
	Forward primer	Reverse primer				
Cg-28S*	GGAGTCGGGTTGTTGAGAATGC	GTTCTTTTCAACTTTCCTCACGG	114	1.97	0.99	AY632555
Cg-GAPDH*	GTTCAAATATGATTCAACTCACGG	TGGATCCCGTTCGAATATACG	109	2.00	0.99	AB122066
Cg-GS	CAAACCCCAAAGAATGCCCTGT	GAAGACCTCACACATACCAGC	153	1.88	0.97	AJ558239
Cg-GST	GACCCAGATGACCCCTACCG	CCGAAACAAACTGAGAGAAGACC	71	1.90	0.99	CB617406
Cg-Cu/znSOD	GACAAAATGATTGACTTGGCCGG	CACTCCACAAGCCAATCGTCCG	144	1.85	0.97	AJ496219
Cg-CPY450	ACAGGGACTTCATTGACAGCATG	ATTGTGAAACGAGTACTGTCTACC	151	1.90	0.99	EF645271
Cg- LGBP γ β 1-3 glucan	TTGTCCAGTCTCCAGCTTCC	GACACTGGAATGGGATGAAGAAC	108	1.95	0.99	CB617438

doi:10.1371/journal.pone.0072323.t001

determined by slope calculation of 4-fold serial dilutions, starting with 80 ng/ μ L of cDNA and using a fixed fluorescence threshold value of 0.0355.

All qPCR reactions were conducted in triplicate in holding Strip Tubes[®] (0.1 mL) (Qiagen[™]), using a Rotor gene 6000 Real-Time PCR detection system[®] (Qiagen[™]). A qPCR cocktail-mix was carefully prepared in our laboratory. The mix contained 50 mM MgCl₂, 2 mM dNTP (each), 0.3 U of Platinum Taq DNA polymerase[®] (Life Technologies, Carlsbad, California), 0.05 μ M of each primer, 20 \times EvaGreen fluorescent dye[®] (Biotium[™], Hayward, CA), and 3.2 ng/ μ L of cDNA in 15 μ L of final volume per reaction.

Amplification conditions were: 95°C (5 min), 40 cycles of 95°C (60 s), 61°C (30 s), and 72°C (5 s) acquiring fluorescence at 79°C (1 s); finally, a dissociation step from 65°C to 95°C (1°C/s) was done. A melting curve analysis of amplification products was performed at the end of each qRT-PCR reaction to confirm that only one PCR product was amplified and detected.

Statistical analysis

Data of qRT-PCR were based on CT values. CT is defined as the PCR cycle at which the fluorescence signal crossed a threshold line that was placed in the exponential phase of the amplification curve. The comparative CT method [30] was used to analyze gene expression levels. The CT for the gene target amplification and the CT for the internal controls 28S ribosomal RNA (28S) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were determined for each sample. The negative control group was used as the reference sample (calibrator). The expression was quantified through $2^{-\Delta\Delta CT}$ [31], which represents an n-fold difference relative to the calibrator.

Data were analyzed using two-way ANOVA; significant differences were obtained with the Fisher's multiple test comparison ($\alpha=0.05$). All analyses were performed with Statistic 8.0[®] software (StatSoft, Tulsa, OK). Significant differences were set at $p<0.05$.

Results

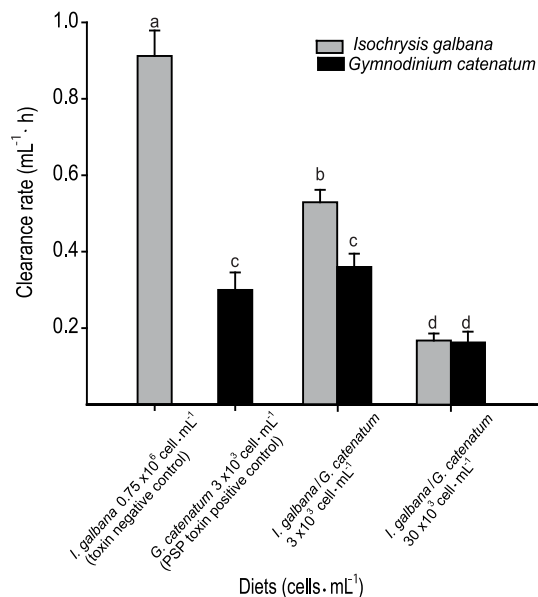
Crossostrea gigas feeding behavior

Oysters showed immediate changes in their feeding behavior after their contact with *G. catenatum*. After a few minutes of dinoflagellate exposure, clearance rate was significantly reduced (data not shown). During the next two hours, organisms showed a partial valve closure with diet mix of 3×10^3 cells mL⁻¹ and with only *G. catenatum* diet (positive control), but shell valve closure was

total in addition to an evident mantle retraction (away from the shell edge) with diet mix of 30×10^3 cells mL⁻¹. However, at 3 h exposure oysters produced pseudo-feces, and only after 4 h exposure did they appear to filtrate normally, principally at 3×10^3 cells mL⁻¹.

Clearance rate was significantly different among treatments and negative control (*I. galbana* diet). At 24 hours, CR data of oysters exposed to different experimental conditions are shown in Figure 1. Oysters fed with negative control had a clearance rate of 0.91 ± 0.03 , while with specific dinoflagellate, CR was reduced to 0.36 ± 0.03 and 0.16 ± 0.03 , with 3×10^3 cells mL⁻¹ and 30×10^3 cells mL⁻¹, respectively. CR showed significant differences (ANOVA, $p<0.05$). It is important to highlight that CR of the positive control (only *G. catenatum* diet) was 0.3 ± 0.05 , similar to that of diet mix of 3×10^3 cells mL⁻¹.

Oysters fed with dinoflagellates (positive control and treatments) exhibited a low feeding activity when compared with those fed with non-toxic microalgae (toxin negative control). At 24 h, oysters fed on negative control had completely consumed their food, while

**Figure 1.** Clearance rate of *Crassostrea gigas* fed *Gymnodinium catenatum* and/or *Isochrysis galbana*.

doi:10.1371/journal.pone.0072323.g001

those fed with toxic dinoflagellates had not. No deaths occurred under the experimental conditions tested.

Gene expression analysis in oysters after acute exposure

Toxic dinoflagellate diet effects on *C. gigas* were evaluated by analyzing expression levels of 5 genes that were chosen since they are involved in stress responses (GS), intermediate immune response activation (LGBP), antioxidant defense (Cu/Zn-SOD), and cell detoxification (GST and CPY450).

Quantitative analyses by PCR were performed to examine the expression patterns of each selected gene during acute response. Expression analyses were done using cDNA samples generated from homogenates of five whole spat oysters (one homogenate for each sampled time and experimental replica).

Expression levels of each target gene in the tested experimental conditions (oysters fed on *I. galbana*/*G. catenatum* mixtures) and positive control (oysters fed on *G. catenatum*) were compared to the toxin negative control condition (oysters fed on *I. galbana*) “baseline”. A stability analysis of a set of reference genes (data not published) showed that the most stable gene pair was 28S and GAPDH. No expression difference was observed between unchallenged and challenged oysters. Hence, these genes were used to normalize transcript levels.

On all analyzed genes, changes at transcription level occurred as acute exposure response to toxic dinoflagellates. The expression levels shown by the Cu/Zn-SOD gene were affected in challenged oysters. The transcript level of mixture with 3×10^3 cells mL⁻¹, increased (0.31 fold) above baseline at the first 12 h post challenge, and these levels were maintained for 24 h. In contrast, transcript abundance in the mixture with 30×10^3 cells mL⁻¹ strongly decreased at first hours (0.4 fold below baseline), and it was equal to baseline at 24 h (Fig. 2a). Transcript abundance increased significantly (1.1 fold above baseline) in oysters fed only *G. catenatum* after 12 h.

GST transcript levels were reduced in mixture with 3×10^3 cells mL⁻¹ and in positive control at first 6 h. A significant expression level increase ($p < 0.05$, Fig. 2b) was observed in all treatments after 12 h post challenge. The highest transcript level was at 12 h (2.6 fold baseline) in mixture with 3×10^3 cells mL⁻¹ and at 24 h (2.3 fold above baseline) in positive control. Contrary to the behavior of the GST gen, GS showed an increase in expression levels at first 6 h in oysters fed mixture with 3×10^3 cells mL⁻¹ and in those fed with positive control diet (Fig. 2c). However, the expression level of these treatments returned to an expression level equal to that of unchallenged oysters at 12 h, and the transcript level increased significantly (0.6 fold) in oysters fed with 30×10^3 cells mL⁻¹. In all treatments a significant expression level decrease ($p < 0.05$) was obtained at 24 h post challenge.

Concerning LGBP, the expression level of challenged oysters increased significantly ($p < 0.05$; Fig. 2d) at 6 h post exposure; we observed the increase of 4.8 fold above baseline. At 12 h post challenge transcript levels were maintained from 2.3 to 3.3 fold above baseline. The highest expression level was observed in all treatments at 24 h. We found a higher increase (18.43 fold) in oysters fed only *G. catenatum*.

The transcript levels of CPY450 gene showed an increase during the first 6 hours principally in oysters fed with mixture of 3×10^3 cells mL⁻¹ and positive control reaching values of 1.6 and 1.2 above baseline, respectively, which were maintained until 12 h. At 12 h, oysters fed mixture with 30×10^3 cells mL⁻¹ their expression level increased 1.5 fold ($p < 0.05$; Fig. 2e). Transcript levels returned to an expression level equal to that of unchallenged oysters in all treatments at 24 h.

Gene expression analysis in oysters after sub-chronic exposure

The genes involved in antioxidant defense and cell detoxification (Cu/Zn-SOD and GST) showed a general pattern of major increase at 7 days post challenged and a reduction in transcript abundance at 14 days in all treatments (Fig. 3a). Cu/Zn-SOD transcript abundance increased in oysters fed with mixture 3×10^3 cells mL⁻¹ (10 fold above baseline, $p < 0.05$). Also, it strongly increased in oysters fed with mixture 30×10^3 cells mL⁻¹ (71 fold above baseline, $p < 0.05$), and finally in oysters fed only *G. catenatum* (18 fold above baseline, $p < 0.05$) at 7 days post challenge; these expression levels decreased at 14 days, nonetheless, they remained above baseline expression. GST transcript abundance changed 3 fold in mixture with 3×10^3 cells mL⁻¹, increasing considerably with 30×10^3 cells mL⁻¹ (15 fold) and in positive control (11 fold). Levels also decreased at 14 days (Fig. 3b). We observed a significant increase ($p < 0.05$; Fig. 3c) on the expression levels of the GS gen in all treatments (4, 5, and 8 fold) above baseline at 7 days. However, expression level decreased in mixture with 3×10^3 cells mL⁻¹ and positive control but strongly increased in 30×10^3 cells mL⁻¹ (13 fold) at 14 days post challenge.

The LGBP gene showed a very particular expression behavior (Fig. 3d). Differences were related to the amount of toxic cells present at the bioassay system; significant differences ($p < 0.05$) were observed mainly in oysters fed with 30×10^3 cells mL⁻¹ at 7 and 14 d (12 fold above baseline). At day 14, this gene remained overexpressed (3 fold) in oysters treated with 3×10^3 cells mL⁻¹, but it was repressed in the positive control.

The CPY450 gene showed a significant increase ($p < 0.05$) with 30×10^3 cells mL⁻¹, which was higher than 15 and 35 fold at 7 d and 14 d post challenged, respectively when compared to unchallenged oysters (Fig. 3e). Expression levels in the positive control were higher, 14 fold above baseline at day 7, but we found they decreased to 7 fold at day 14.

The results indicated that the expression levels of these 5 genes in *C. gigas* were affected by the presence of the toxic dinoflagellate, and the magnitude was dependent on time and toxic cell concentration.

Discussion

As a filter-feeder species, *C. gigas* may accumulate toxins [1,4,5,32] and xenobiotics [33–35]; thus toxin presence is one of the major determinants of its sanitary quality. Toxin mechanisms and effects in human and other mammalian species are widely known. However, only recently have researchers begun to study toxic microalgal effects in mollusks (vectors for human toxins), determining they have been mainly physiological [1,6,9]. Even less studied are HAB impact effects on filter-feeder organisms, considering shellfish as part of an ecosystem. Thus experiments in this work were designed exposing *C. gigas* to *G. catenatum* cells under experimental conditions to get new information from a different viewpoint. Our goal was to analyze changes occurring in a filter-feeder organism when exposed to toxins through a red tide event (in our case PSP through *G. catenatum*). Finally, duration of the bioassays was designed to determine short and medium term effects (24 h and 14 days), emulating early and developed stages of a red tide up to its exponential phase. Although this study is limited since it does not consider variables such as simultaneous presence of several phytoplankton species, succession phenomena, and decay, we know it is a good starting point for analyzing the effect of marine toxin producers considering *G. catenatum* and *C. gigas* as study models given their ecological, economic, and public health relevance.

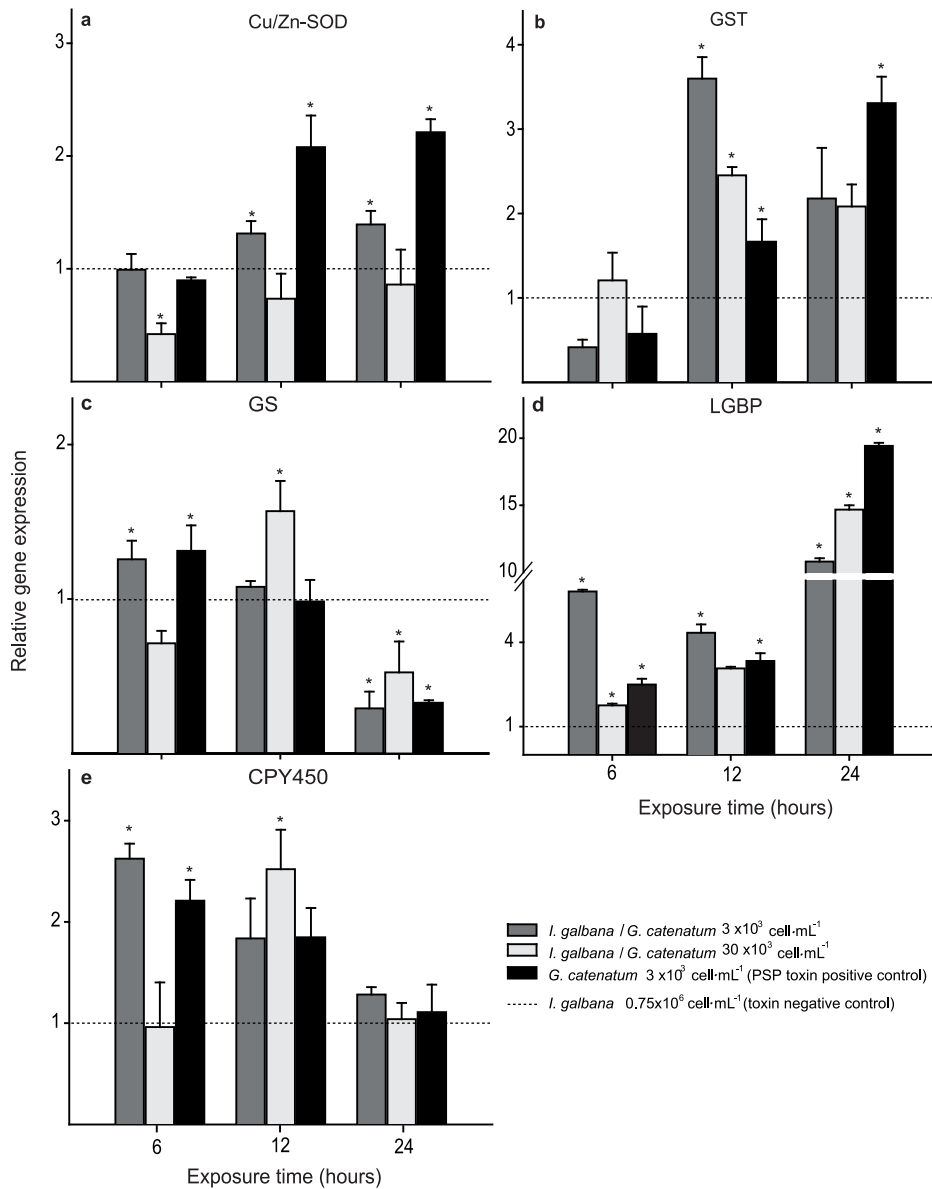


Figure 2. Quantitative expression (qPCR) of *Crassostrea gigas* target genes at acute exposure to *Gymnodinium catenatum* and/or *Isochrysis galbana* cells. Panels: a) Copper/zinc superoxide dismutase, b) Glutathione S transferase, c) Glutamine synthetase, d) Lipopolysaccharide and beta glucan binding protein, and e) Cytochrome p450. Each gene expression is shown as relative expression ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) with 28S ribosomal and GAPDH as endogenous controls. Asterisk indicates significant differences between treatments and negative control ($p < 0.05$ in Fisher's HSD). doi:10.1371/journal.pone.0072323.g002

Several species of harmful algae have shown previously to affect oysters' and other bivalves' feeding. For example, *C. gigas* reduces its clearance rate when exposed to the toxic dinoflagellates *Alexandrium minutum*, *Alexandrium tamarense*, and *Alexandrium catenella* [11,12,36–40]. Our results revealed that during the first 2 hours, treated oysters filtered a moderate quantity of toxic dinoflagellates, showing a partial valve closure behavior. On the other hand, our results showed that oysters preferentially remove *I. galbana* over *G. catenatum* from the mixed microalgae offered as food. In oysters fed with a mixture of 3×10^3 cells mL⁻¹ a clear preference for ingesting *I. galbana* was observed but not in the mixture with 30×10^3 cells mL⁻¹ where only 20% of available cells were removed, independently of the microalgal species (*I. galbana* and/or *G. catenatum*).

In all treatments and positive control (only *G. catenatum*) filtration rate was significantly lower than in the negative control, which showed a CR rate of 91% at 24 h. In general, an inverse relationship between CR and toxic cell dose level was observed. No deaths were registered in acute and sub-chronic exposure, which indicate that oysters can cope with adverse effects of toxic cell consumption.

As mentioned briefly before, we observed pseudo-feces formation in treatments with toxic microalgae, finding a direct relationship between the amounts produced with the cell number provided (data not shown). However, in the mixture with 3×10^3 cells mL⁻¹ diet *G. catenatum* dominated in pseudo-feces composition, indicating that oysters selectively remove it over *I. galbana* (Fig. 1). Under a high cell density condition (30×10^3 cells mL⁻¹)

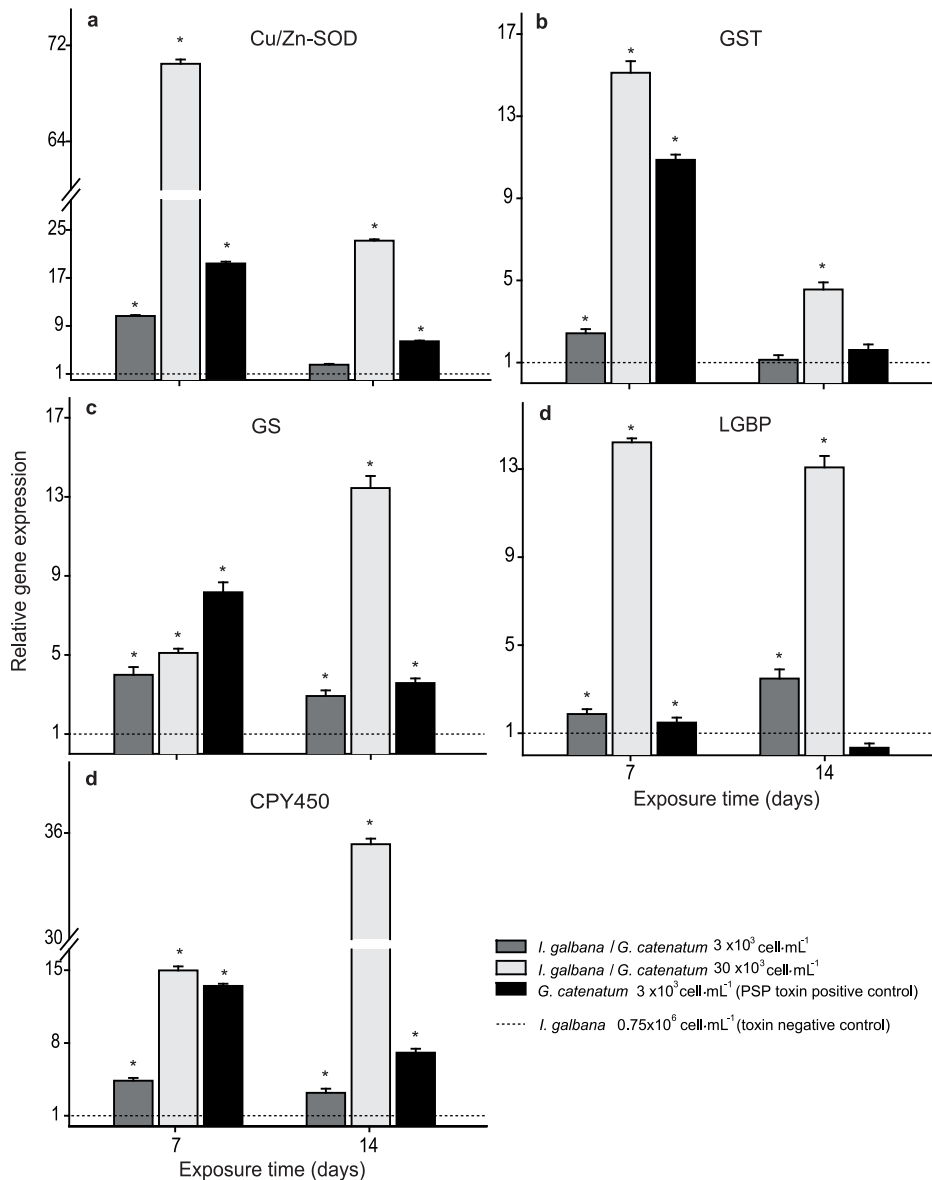


Figure 3. Quantitative expression (qPCR) of *Crassostrea gigas* target genes at sub-chronic exposure to *Gymnodinium catenatum* and/ or *Isochrysis galbana* cells. Panels: a) Copper/zinc superoxide dismutase, b) Glutathione S transferase, c) Glutamine synthetase, d) Lipopolysaccharide and beta glucan binding protein, and e) Cytochrome p450. Each gene expression is shown as relative expression ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) with 28S ribosomal and GAPDH as endogenous controls. Asterisk indicates significant differences between treatments and negative control ($p < 0.05$ in Fisher's HSD).

doi:10.1371/journal.pone.0072323.g003

oysters' selectivity is lost because both species are cleared from the system in the same proportion, which can be explained under food availability conditions in excess or provoked by the dinoflagellate toxicity.

In the first scenario, pseudo-feces production has been documented as a fundamental pre-ingestion mechanism [5,8,10], not only preventing exceeding the animal's ingestion capacity [10,32,37,40] but also facilitating particle selection: less nutritious particles are rejected, thus the quality of ingested material is proportionally improved [5,36,37,40]. However, in our work we demonstrated that the addition of a toxic dinoflagellate as *G. catenatum* in a diet added with the haptophyte *I. galbana* significantly altered *C. gigas*' filtering capacity and pseudo-feces production. Similar behavior was observed in previous studies [40–42]. Given

the above, it is demonstrated that the oysters have a higher sensitivity to phycotoxin-producing microalgae.

Genomic approaches allowed a better understanding on the biochemical pathways affected by several test-conditions. For this purpose five genes were selected considering they have different physiological roles, and any or all could be a sensitive tool to detect changes when oysters were exposed to toxic dinoflagellates. In general terms, when *C. gigas* was exposed to *G. catenatum*, the observed responses were time-dependent and exhibited a linear dose-response relationship mainly in the sub-chronic period. Therefore, we found statistically significant differences in the interaction dose-exposure-time. Although basal expression levels of the oysters fed on negative control exhibited certain variability, changes were small with short duration over the course of the

bioassay. In treatments, changes in transcript levels (dose-time dependent) suggested a direct relationship to toxic algal ingestion. Change magnitude as well as particular effects could be based on a particular gene's susceptibility to any component of the toxic dinoflagellate.

Antioxidant enzymes have been proposed as environmental impact assessment markers due to metals and some organic xenobiotics that generate oxidative stress [43–45]. Cu/Zn-SOD is a cytosolic enzyme that has antioxidant properties. Its function is superoxide radical dismutation ($O_2^{\cdot-}$) to hydrogen peroxide (H_2O_2) and oxygen, during oxidative energy processes [43,44] diminishing destructive oxidative processes in cells.

At 6 hours, transcript levels were equal to those of unchallenged oysters in positive control and mixture with 3×10^3 cells mL^{-1} but increased after 12 h of exposure. This result might be interpreted that the number of *G. catenatum* cells (3×10^3 cells mL^{-1}) causes a net positive effect on Cu/Zn-SOD expression in spite of an expression adaptation (increase) that balances conditions allowing an apparent homeostasis in the oyster. We also found that following a brief exposure period with 30×10^3 cells mL^{-1} , the Cu/Zn-SOD expression level was mainly suppressed; the harmful effect was obvious because expression repression persisted from the beginning of the experiment to 24 h, recovering slowly.

However, the trend observed was major under sub-chronic exposure (Fig. 3a) where it revealed an increase in transcript synthesis, finding significantly higher values in 30×10^3 cells mL^{-1} and in the positive control when compared with mixture of 3×10^3 cells mL^{-1} . In the same figure, it draws our attention that in the positive control Cu/Zn-SOD expression level is higher, independently of exposure time but even higher at 7 days. The difference between these two experimental conditions is the presence of *I. galbana* in the diet, which somehow mitigates damage in the oyster, decreasing the magnitude of the impact.

Recent evidence showed that Cu/Zn-SOD are involved in cell response to many environmental and physiological stressors, which include studies in *C. gigas*, mainly after heavy-metal exposure [45,46], thermal [47], summer mortality [48], pesticide exposure [34,35,49], toxic dinoflagellate *P. lima* exposure [17], finding that transcript levels increased after stress challenges. The Cu/Zn-SOD overexpression is indicative of oxidative stress generated by ROS in oysters, which is the strategy to compensate damage at cellular level, increasing in transcription and then increasing mortality resistance. Therefore, a stronger correlation has been observed between phycotoxins and oxidative damage [17,50].

Glutathione S-transferase (GST) belongs to a large superfamily of multi-functional enzymes involved in cellular detoxification by catalyzing glutathione (GSH) conjugation to electrophilic compounds with a wide range of endogenous and xenobiotic agents, including environmental toxins and oxidative stress products [51–53]. The GST gene transcript levels showed significant differences between oysters exposed to *G. catenatum* and *I. galbana*, so presumably it is regulated and involved in the oysters' metabolism of PST toxin management. In our research we also found that GST expression was low at 6 h in all treatments; however, GST was overexpressed after 12 h in challenged oysters. An early response of *C. gigas* to the presence of *G. catenatum* has been documented and also shown in our study as a decrease in feed through valve closure [41] together with palatability of food as a mechanism of tissue damage resistance [5,36,37]. In a sub-chronic exposure, the highest overexpression was found on day 7 (mixture of 30×10^3 cells mL^{-1} and positive control). A GST overexpression was observed in *C. gigas* exposed to contaminants [53] under sub-chronic exposure as in our work.

The biochemical adaptations that involve a gene response against xenobiotics, as the GST activity, could partly explain the consumers' reluctance to food chemical threats and provide information about enzymatic mechanisms underlying foraging decisions [45,54,55]. GST induction with an allelochemical diet can serve as an additional adjustment mechanism of protection against toxicity [54,55]; this phenomenon may be present in our study system (oyster-toxic dinoflagellate).

The differences on GST transcript level among treatments could be due to detoxification processes normally associated with stress [44,50,51], explaining the high GST expression observed in oysters exposed to toxic cells. Moreover, it has been found that oysters have high toxic accumulation on tissues after seven days of exposure [1,9], which agrees with our observations of increased GST transcripts on exposed oysters during similar time periods; these results contribute to a better understanding of the GST role and the presence of resistance mechanisms towards a toxic dinoflagellate diet. Furthermore, a recurrent GST up-regulation could be associated to an increase of the animal's resistance to stressors, including toxic compounds [54].

Glutamine synthetase (GS) is an enzyme that plays a central role in nitrogen metabolism by catalyzing the chemical reaction of ammonium to glutamate and glutamine formation; it detoxifies ammonia and conveys nitrogen towards urea, amino acid, and nucleotide biosynthesis [56]. In our work a high GS expression level was found in mixture of 3×10^3 cells mL^{-1} and positive control on dinoflagellate-exposed oysters in regard to control, but the highest increase was at 12 h of exposure in mixture of 30×10^3 cells mL^{-1} . The harmful effect of toxic cell presence on oysters was obvious because of expression repression at 24 h. These data suggest that the only presence of *G. catenatum* affects the oyster's metabolism even in short exposure periods. Likewise, GS expression increase was highly regulated by dinoflagellate cell concentration since responses were time-dependent and exhibited a positive linear dose-response relationship under sub-chronic exposure.

Several studies have found that the GS gene is up regulated in oysters exposed to hydrocarbons [53], hypoxia [57], pesticides [34,35,49,53], or to toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* [17], playing an important role in the organisms' resistance to these stressors. Some studies suggest that glutamine produced by GS is required in the formation of amino acids, purines, and pyrimidines that are essential on protein synthesis [56]. Thus, in our research the increase of GS transcript abundances observed on exposed oysters could reflect an increase in protein synthesis, essential for regulating homeostasis in challenged oysters to dinoflagellates.

The lipopolysaccharide and beta-1, 3-glucan binding protein (LGBP) plays a crucial role in invertebrates' innate immune response [58]. The binding of lipopolysaccharide and/or β -1, 3-glucan to LGBP activates the pro-phenoloxidase cascade, which is apparently a general response of *C. gigas* to stress exposure whatever its abiotic or biotic nature is [58–60]. The host defense mechanism can be divided in three essential steps: detecting infecting microorganisms, activating intracellular signaling pathways, and triggering the effector mechanism [58]. The LGBP is an acute phase protein that plays a critical role in host-parasite interactions, essential in the overall response of invertebrates' innate immune system.

Our results indicate a differential response on LGBP related to the tested treatment and exposure time because an overexpression was observed both in the beginning of the bioassay and under sub-chronic exposure (in oysters fed with 30×10^3 cells mL^{-1} for 14 days; Fig. 3d). In our study, the protective immune response activation on oysters exposed to *G. catenatum* suggests that oysters

perceive this dinoflagellate as a non-owned element that could function as a potential invader rather than experiencing physiological impairment due to a chemical toxin in *G. catenatum*; it is noteworthy that oysters did not have the same response in the presence of *I. galbana*.

Although many studies have assessed the effects of harmful algae and their toxins upon bivalves' immune systems, biological interactions between them are poorly understood, especially at molecular level. This gene was previously identified in up regulated SSH libraries from *C. gigas* exposed to hydrocarbons [35] and parasites [61]. Our report provides the first evidence that exposure to *G. catenatum* toxic cells temporarily increases LBGP gene expression and could play a critical role on *C. gigas*-*G. catenatum* interaction.

The cytochrome P450 (CYP450) supergene family is a large and diverse group of enzymes that generally constitute the first enzymatic defense against foreign compounds. It is characterized as one of the major phase I-type class of detoxification enzymes found in living organisms. These enzymes metabolize a wide variety of substrates, such as fatty acids, hormones, and xenobiotics [62]. Alteration on both CYP450 and glutathione S-transferase has been found in marine organisms after exposure to allelochemical gorgonian corals [54] and to many typical pollutants that are continuously released into the environment: polycyclic aromatic hydrocarbons, heavy metals (e.g. Pb and Cu), and endocrine disruptor chemicals [63,64]

Overexpression patterns of this important detoxification enzyme were found in sub-chronic exposure; these data suggest a possible role of CPY450 in protecting oysters exposed to toxic cells; even more, CPY450 expression changes were dependent on tested cell concentration. On the other hand, it is well known that bivalves accumulate and metabolize toxins, resulting in conjugated, oxidized, reduced, and hydrolyzed metabolites [1,65]. Nevertheless, PST biotransformation associated to cytochrome P450 activity has not been described in *C. gigas* yet; thus the observed increase on the CYP450's transcript level found in our work opens the opportunity to study if this enzyme is involved and how in this association.

In our work, we have demonstrated the toxic effect caused by *G. catenatum* using whole cells. It is important to consider that metabolic byproducts other than toxins may contribute to the effects observed by affecting cell membranes or particular organ systems which in sum could affect animal health and ultimately cause disease. Additionally, we provide here the first evidence that

exposure to toxic *G. catenatum* cells generates an increase on the expression levels of genes encoding proteins involved in antioxidant stress, detoxification, stress response, and immune defense. We have demonstrated that a low cell number of *G. catenatum* and a short exposure time is enough for *C. gigas* to inhibit or to overexpress these genes, and that a sub-chronic exposure induces major changes in expression profiles. Therefore, the stress induced by the presence of *G. catenatum* probably increases oysters' susceptibility to invasion of opportunistic pathogens, which occurs in natural events since oyster populations die from secondary infections. Further studies can provide further understanding on how *G. catenatum* toxins activate/deactivate oysters' defense systems.

Conclusions

Toxic dinoflagellate ingestion by oysters causes stress, according to physiological alterations in feeding behavior, antioxidant enzyme modulation of mRNA expression, and the immune system in a way that it depends directly on dose and exposure time. A *G. catenatum* diet appears to alter the homeostasis of oysters' stress genes temporarily, causing diminished health and thus an increase in disease susceptibility. These findings aid in understanding oysters' genomic response to toxic dinoflagellates, making it clear that molecular biology and biochemistry approaches are fundamental tools to identify genes/proteins that have a major role in the toxicity process, and thus in better understanding those impacts.

Acknowledgments

The authors are grateful to CONACyT and Instituto Tecnológico de La Paz; CIBNOR technical staff: A. Sierra-Beltrán for manuscript discussions support; A. Greene-Yee, C. Aldana-Avilés, J. Garzón-Favela, and M. Virgen-Félix from the Live Food Lab of the Aquaculture Program for providing live food for bioassays; M. Moreno from the Environmental Microbiology Lab for statistical support; and D. Dorantes for English editing.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: NYHS NGL. Performed the experiments: NGL RRG. Analyzed the data: NGL RRG. Contributed reagents/materials/analysis tools: NYHS. Wrote the paper: NGL NYHS. Interpretation of data: NGL RRG.

References

1. Bricelj VM, Shumway SE (1998) Paralytic shellfish toxins in bivalve mollusks: occurrence, transfer kinetics and biotransformation. *Rev Fish Sci* 6: 315–383.
2. Lehane L (2000) Paralytic shellfish poisoning: a review. National Office of Animal and Plant Health, Agriculture, Fisheries and Forestry: Canberra, Australia. 56 p
3. Kodama M (2010) Paralytic Shellfish Poisoning Toxins: Biochemistry and Origin. *ABSM* 3: 1–38.
4. Lassus P, Baron R, Garen P, Truquet P, Masselin P, et al. (2004) Paralytic shellfish poison outbreaks in the Penzé estuary: Environmental factors affecting toxin uptake in the oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat Living Resour* 214: 207–214.
5. Bardouil M, Bohec M, Cormerais M, Bougrier S, Lassus P (1993) Experimental study of the effects of a toxic microalgal diet on feeding of the oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *J Shellfish Res* 12: 417–422.
6. Landsberg JH (2002) The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. *Rev Fish Sci* 10: 113–390.
7. Van Dolah FM (2000) Marine algal toxins: origins, health effects, and their increased occurrence. *EHP* 108: 133–141
8. Bricelj VM, Lee JH, Cembella AD, Anderson DM (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.
9. Shumway SE (1990) A review of the effects of algal blooms on shellfish and aquaculture. *J World Aquacul Soc* 2: 65–104.
10. Alexander JA, Stoeker DK, Meritt DW, Alexander ST, Johns D, et al. (2008) Differential production of feces and pseudo-feces by the oyster *Crassostrea ariakensis* when exposed to diets containing harmful dinoflagellate and raphidophyte species. *J Shellfish Res* 27(3): 567–579.
11. Li SC, Wang WX, Hsieh DPF (2002) Effects of toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* on the energy budgets and growth of two marine bivalves. *Mar Environ Res* 53: 145–160.
12. Haberkorn H, Lambert C, Le Goïc N, Moal J, Suquet M, et al. (2010) Effects of *Alexandrium minutum* exposure on nutrition-related processes and reproductive output in oysters *Crassostrea gigas*. *Harmful Algae* 9: 427–439.
13. Gainey LF, Shumway SE (1988) A compendium of the responses of bivalve mollusks to toxic dinoflagellates. *J Shellfish Res* 7: 623–628.
14. Hégaré H, Wikfors GH, Soudant P, Lambert C, Shumway SE, et al. (2007) Minimal apparent effect on oyster hemocytes. *Fish & shellfish immunology* 152: 441–447.
15. Hégaré H, Brokordt KB, Gaymer CF, Lohrmann KB, García C, et al. (2012) Effects of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* on histopathological and escape responses of the northern scallop *Argopecten purpuratus*. *Harmful Algae* 18: 74–83.
16. Mello DF, de Oliveira ES, Vieira RC, Simoes E, Trevisan R, et al. (2012) Cellular and transcriptional responses of *Crassostrea gigas* hemocytes exposed in vitro to brevetoxin (PbTx-2). *Marine drugs* 10: 583–597.

17. Romero-Geraldo RJ, Hernández-Saavedra NY (2012) Stress gene expression in *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) in response to experimental exposure to the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge, 1975. *Aquac Res* 1–11 doi: 10.1111/are.12100.
18. Hernández-Sandoval F, López-Cortés DJ, Band-Schmidt C, Gárate-Lizárraga I, Núñez-Vásquez E (2009) Paralytic toxins in bivalve mollusks during a proliferation of *Gymnodinium catenatum* Graham in Bahía de La Paz, Mexico. *Hidrobiológica* 19: 245–256.
19. Pérez-Linares J, Ochoa JL, Gago-Martínez A (2008) Effect of PSP toxins in white leg shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931. *JFS* 73: 69–73.
20. Pérez-Linares J, Ochoa JL, Gago-Martínez A (2009) Retention and tissue damage of PSP and NSP toxins in shrimp: Is cultured shrimp a potential vector of toxins to human population. *Toxicol*, 53: 185–195.
21. Guillard RLL, Ryther RH (1975) Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In Smith, W.L. and M.M., Chalch, (Eds) Culture of marine invertebrate animals, Plenum Press, New York. pp. 29–60.
22. Band-Schmidt CJ, Bustillo-Guzmán J, Gárate-Lizárraga I, Lechuga-Devéze CH, Reinhart K, et al. (2005) Paralytic shellfish toxin profile in strains of dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham and the scallop *Argopecten ventricosus* G-B. Sowerby II from Bahía Concepción. Gulf of California México. *Harmful Algae* 4: 21–31.
23. Gifford DJ, Caron DA (2000) Sampling, preservation, enumeration and biomass of marine protozooplankton. In: Harris RP, et al (Eds) ICES Zooplankton methodology manual. Academic Press, London. pp. 193–221.
24. Brown MR, Jeffrey SW, Volkman JK, Dunstan GA (1997) Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151: 315–331.
25. Helm MM, Bourne N, Lovatelli A (2004) Hatchery culture of bivalves. A practical manual. FAO Fisheries Technical Paper. 177 p.
26. Gárate-Lizárraga I, Bustillos-Guzmán J, Alonso-Rodríguez R, Luckas B (2004) Comparative paralytic shellfish toxin profiles in two marine bivalves during outbreaks of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) in the Gulf of California. *Mar Pollut Bull* 48: 397–402.
27. Band-Schmidt CJ, Bustillos-Guzmán JJ, López-Cortés DJ, Gárate-Lizárraga I, Núñez-Vásquez EJ (2010) Ecological and physiological studies of *Gymnodinium catenatum* in the Mexican Pacific: a review. *Marine drugs* 8: 1935–1961.
28. Coughlan J (1969) The estimation of filtering rate from the clearance of suspensions. *Mar Biol* 2: 356–358
29. Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 169–193.
30. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, et al. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: 1–12.
31. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods* (San Diego, California) 25: 402–408.
32. Bougrier S (2003) Paralytic shellfish poison accumulation yields and feeding time activity in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and king scallop (*Pecten maximus*). *Aquat Living Resour* 16: 347–352.
33. Gagnaire B, Thomas-Guyon H, Burgeot T, Renault T (2006) Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), hemocytes: Screening of 23 molecules using flow cytometry. *Cell Biol Toxicol* 22: 1–14.
34. Collin H, Meistertzheim AL, Moraga D, Boutet I (2010) Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793), to pesticide exposure under experimental conditions. *J Exp Biol* 213: 4010–4017.
35. Boutet I, Tanguy A, Moraga D (2004) Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene* 329: 147–157.
36. Lassus P, Wildish D, Bardouil M, Martin JL, Bohec M, et al. (1996) Ecophysiological study of toxic *Alexandrium* spp. effects on the oyster *Crassostrea gigas*. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y. (Eds.), *Harmful and Toxic Algal Blooms*. IOC-UNESCO Publ. pp. 409–412.
37. Wildish D, Lassus P, Martin J, Saulnier A, Bardouil M (1998) Effect of the PSP causing dinoflagellate, *Alexandrium* spp. on the initial feeding response of *Crassostrea gigas*. *Aquat Living Resour* 11: 35–43.
38. Laabir M, Amzil Z, Lassus P, Masseret E, Tapilatu Y, et al. (2007) Viability, growth and toxicity of *Alexandrium catenella* and *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) following ingestion and gut passage in the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquat Living Resour* 57: 51–57.
39. Lassus P, Amzil Z, Baron R, Séchet V, Barillé L, et al. (2007) Modelling the accumulation of PSP toxins in Thau Lagoon oysters (*Crassostrea gigas*) from trials using mixed cultures of *Alexandrium catenella* and *Thalassiosira weissflogii*. *Aquat Living Resour* 67: 59–67.
40. Haberkorn H, Lambert C, Le Goïc N, Guéguen M, Moal J, et al. (2010) Effects of *Alexandrium minutum* exposure upon physiological and hematological variables of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*. *Aquatic toxicol* 97: 96–108.
41. Estrada NA, Lagos N, García C, Maeda-Martínez A, Ascencio F (2007) Effects of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* on uptake and fate of paralytic shellfish poisons in the Pacific giant lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus*. *Mar Biol* 151: 1205–1214.
42. Navarro JM, Contreras AM (2010) An integrative response by *Mytilus chilensis* to the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Marine Biology* 157: 1967–1974.
43. Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) Free radicals in biology and medicine. New York: Oxford Univ. Press. 936 p
44. Lesser PM (2006) Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and Physiological Ecology. *Annual Review of Physiology* 68: 253–78.
45. Tomanek L (2011) Environmental proteomics: changes in the proteome of marine organisms in response to environmental stress, pollutants, infection, symbiosis, and development. *Annu Rev Mar Sci* 3: 373–399.
46. Jenny MJ, Ringwood AH, Schey K, Warr GW, Chapman RW (2004) Diversity of metallothioneins in the American oyster, *Crassostrea virginica*, revealed by transcriptomic and proteomic approaches. *Eur J Biochem* 271: 1702–1712.
47. Meistertzheim A, Tanguy A, Moraga D (2007) Identification of differentially expressed genes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to prolonged thermal stress. *FEBS J* 274: 6392–6402.
48. Huvet A, Herpin A, Dégremont L, Labreuche Y, Samain JF, et al. (2004) The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene* 343: 211–220.
49. 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. *FEBS J* 272: 390–403.
50. Estrada N, Campa-Córdova A, Luna A, Ascencio F (2007) Effects of the toxic dinoflagellate, *Gymnodinium catenatum* on hydrolytic and antioxidant enzymes, in tissues of the giant lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus*. *Comp Biochem Phys C* 146: 502–510.
51. Manduzio H, Rocher B, Durand F, Galap C, Le Boulenger F (2005) The point about oxidative stress in mollusks. *ISJ* 2: 91–104.
52. Campa-Córdova AI, González-Ocampo H, Luna-González A, Mazón-Suástegui JM, Ascencio F (2009) Growth, survival, and superoxide dismutase activity in juvenile *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) treated with probiotics. *Journal of Aquaculture in the Tropics* 19: 151–157.
53. Boutet I, Tanguy A, Moraga D (2004) Characterization and expression of four mRNA sequences encoding glutathione S-transferases pi, mu, omega and sigma classes in the Pacific oyster. *Mar Biol* 146: 53–64
54. Vrolijk NH, Targett NM (1992) Biotransformation enzymes in *Cyphoma gibbosum* (Gastropoda: Ovulidae): implications for detoxification of gorgonian allelochemicals. *Mar Environ Res* 88: 237–246.
55. Whalen EK, Morin D, Lin YC, Tjeerdema SR, Goldstone VJ (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.
56. Keppler CJ (2007) Effects of ammonia on cellular biomarker responses in oysters (*Crassostrea virginica*). *Ecol Eng* 63–66.
57. David E, Tanguy A, Pichavant K, Moraga D (2005) Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. *FEBS J* 272: 5635–5652.
58. Girón-Pérez MI (2010) Relationships between innate immunity in bivalve mollusks and environmental pollution. *ISJ* 7: 149–156.
59. Guéguen Y, Cadoret JP, Flament D, Barreau-Roumigué C, Girardot AL, et al. (2003) Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene* 303: 139–145.
60. Montagnani C, Avarre JC, de Lorgeril J, Quiquand M, Boulo V, et al. (2007) First evidence of the activation of Cg-timp, an immune response component of Pacific oysters, through a damage-associated molecular pattern pathway. *Dev Comp Immunol* 31: 1–11.
61. Tanguy A, Ximing G, Ford SE (2004) Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*C. gigas*) oysters. *Gene* 338: 121–131.
62. Ziegler DM (1993) Recent studies on structure and function of multisubstrate flavin-containing monooxygenases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 33: 179–199.
63. Tanguy A, Boutet I, Bonhomme F, Boudry P, Moraga D (2002) Polymorphism of metallothionein genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* as a biomarker of response to metal exposure. *Biomarkers* 7:439–450.
64. Boutet I, Tanguy A, Moraga D (2004) Molecular identification and expression of two non-P450 enzymes, monoamine oxidase A and flavin-containing monooxygenase 2, involved in phase I of xenobiotic biotransformation in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1679: 29–36.
65. Choi MC, Hsieh DPH, Lam PKS, Wang WX (2003) Field depuration and biotransformation of paralytic shellfish toxins in scallop *Chlamys nobilis* and green-lipped mussel *Perna viridis*. *Mar Biol* 143: 927–934.

Elsevier Editorial System(tm) for Harmful Algae
Manuscript Draft

Manuscript Number: HARALG-D-14-00033

Title: Histopathological alterations in *Crassostrea gigas* by exposure to *Gymnodinium catenatum* and changes on transcription rates of the genes involved in cell cycle regulation, inflammatory process, and cytoskeleton

Article Type: Original Research Article

Keywords: toxins PST; *Crassostrea gigas*; *Gymnodinium catenatum*; Histopathology; gene expression

Corresponding Author: Mrs. Norma Yolanda Hernandez Saavedra, Dr

Corresponding Author's Institution: Centro de Investigaciones Biologicas del Noroeste, S.C.

First Author: Norma García-Lagunas, M S

Order of Authors: Norma García-Lagunas, M S; Norma Yolanda Hernandez Saavedra, Dr; Reyna Romero-Geraldo, Dr; Carmen Rodríguez-Jaramillo, M S

Abstract: Paralytic shellfish toxins (PSTs) are potent neurotoxins produced by the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. Studies indicated that marine toxins are genotoxic and may also act as tumor initiators. In laboratory assays juvenile *Crassostrea gigas* were exposed to concentrations of 0, 3, and 30 x 10³ cel.mL⁻¹ of *G. catenatum* during 3, 7, and 14 days of exposure; *Isochrysis galbana* was used as nontoxic-alga control. In our work evidences of histological injuries, principally on oysters' digestive gland tubules and muscle, are shown as a result of their exposure to *G. catenatum*. The epithelium of digestive gland tubules was severely thinned, and hemocyte diapedesis to lumen was also observed. Severe muscle mass loss and neoplasia were observed principally in oysters fed with 30 x 10³ cell.mL⁻¹ of *G. catenatum*. We explored the dinoflagellate ingestion effect in transcription rates of the selected genes involved in cell cycle regulation, inflammatory process, and cytoskeleton by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). A significant expression increase was found in those genes participating on cell cycle regulation (p21, p53, CAFp55, EF2), and in a gene related to the inflammatory process (CASP 1) mainly at 7 days of exposure, reaching maximal values with 30 x 10³ cells.mL⁻¹ of *G. catenatum* (p <0.05). An increase of the ACT gene transcription was also observed; however, the TUB β gene was down-regulated at 14 days. The up-regulation of p21 and p53 transcription genes provides a strong evidence of PST genotoxicity. Transcript increase of CASP 1 suggests an apoptotic process is in progress on *C. gigas*. Changes in expression of the ACT and TUB β genes observed on exposed oysters are probably responsible of alterations in cytoskeletal arrangement, and thus structural loss. Our results provide molecular evidence and clearly show tissue damage due to exposure to the PST dinoflagellate producer highlighting genotoxicity occurrence and tissue repair failure.

Suggested Reviewers: Kathi Lefebvre Dr

Supervisory Research Biologist , Exposure Assessment and Biomedical Models, Northwest Fisheries Science Center, National Marine Fisheries Service, NOAA

Kathi.Lefebvre@noaa.gov

Dra Lefebvre's research focuses on the effects of naturally occurring marine seafood toxins on wildlife. Her research encompasses different areas such as ecology, physiology and molecular biology

1 **Histopathological alterations in *Crassostrea gigas* by exposure to**
2 ***Gymnodinium catenatum* and changes on transcription rates of the genes**
3 **involved in cell cycle regulation, inflammatory process, and cytoskeleton**

4

5 Norma García-Lagunas¹, Reyna de Jesús Romero-Geraldo^{1,2}, Carmen Rodríguez-
6 Jaramillo³ and Norma Yolanda Hernández-Saavedra^{1*}

7

8 ¹ Molecular Genetics Laboratory, Centro de Investigaciones Biológicas del
9 Noroeste, S.C. (CIBNOR), Avenida Instituto Politécnico Nacional No. 195, Playa
10 Palo de Sta. Rita Sur, Apartado Postal128. La Paz, 23096, Baja California Sur,
11 México. E-mail: nhernan04@cibnor.mx; nlagunas@yahoo.com.

12

13 ² Instituto Tecnológico de La Paz, Boulevard Forjadores de Baja California Sur No.
14 4720. Apartado Postal 43-B. La Paz, 23080, Baja California Sur, México. E-mail:
15 reynaromerog@yahoo.com.mx.

16

17 ³ Histology and Histochemistry Laboratory, Centro de Investigaciones Biológicas
18 del Noroeste, S.C. (CIBNOR), Avenida Instituto Politécnico Nacional No. 195,
19 Playa Palo de Sta. Rita Sur, Apartado Postal 128. La Paz, 23096, Baja California
20 Sur, México. E-mail: jaramillo04@cibnor.mx.

21

22 (*) Corresponding author: Norma Y. Hernández-Saavedra, Molecular Genetics
23 Laboratory, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR),
24 Avenida Instituto Politécnico Nacional No. 195, Playa Palo de Sta. Rita Sur,
25 Apartado Postal128. La Paz, 23096, Baja California Sur, México. Phone: +52
26 61212 38496; Fax: +52 6121253625; nhernan04@cibnor.mx

27

28

29 **Abstract**

30 Paralytic shellfish toxins (PSTs) are potent neurotoxins produced by the
31 dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. Studies indicated that marine toxins are
32 genotoxic and may also act as tumor initiators. In laboratory assays juvenile
33 *Crassostrea gigas* were exposed to concentrations of 0, 3, and 30×10^3 cel.mL⁻¹ of
34 *G. catenatum* during 3, 7, and 14 days of exposure; *Isochrysis galbana* was used
35 as nontoxic-alga control. In our work evidences of histological injuries, principally
36 on oysters' digestive gland tubules and muscle, are shown as a result of their
37 exposure to *G. catenatum*. The epithelium of digestive gland tubules was severely
38 thinned, and hemocyte diapedesis to lumen was also observed. Severe muscle
39 mass loss and neoplasia were observed principally in oysters fed with 30×10^3
40 cell.mL⁻¹ of *G. catenatum*. We explored the dinoflagellate ingestion effect in
41 transcription rates of the selected genes involved in cell cycle regulation,
42 inflammatory process, and cytoskeleton by quantitative real-time polymerase chain
43 reaction (qRT-PCR). A significant expression increase was found in those genes
44 participating on cell cycle regulation (*p21*, *p53*, *CAFP55*, *EF2*), and in a gene
45 related to the inflammatory process (*CASP 1*) mainly at 7 days of exposure,
46 reaching maximal values with 30×10^3 cells.mL⁻¹ of *G. catenatum* ($p < 0.05$). An
47 increase of the *ACT* gene transcription was also observed; however, the *TUB β*
48 gene was down-regulated at 14 days. The up-regulation of *p21* and *p53*
49 transcription genes provides a strong evidence of PST genotoxicity. Transcript
50 increase of *CASP 1* suggests an apoptotic process is in progress on *C. gigas*.
51 Changes in expression of the *ACT* and *TUB β* genes observed on exposed oysters

52 are probably responsible of alterations in cytoskeletal arrangement, and thus
53 structural loss. Our results provide molecular evidence and clearly show tissue
54 damage due to exposure to the PST dinoflagellate producer highlighting
55 genotoxicity occurrence and tissue repair failure.

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70 1. Introduction

71 Mass proliferation occurrence of toxic algae on marine environments known as
72 harmful algal blooms (HABs) is a worldwide problem (Langberg et al., 2002). The
73 Paralytic Shellfish Toxin (PST) poses a serious threat to public health and
74 immeasurable economic damage (Mons et al., 1998; Lehane, 2000; Llewellyn,
75 2006). During a HAB event, a variety of marine organisms have been found to
76 accumulate PST (Gainey and Shumway, 1988; Bricelj and Shumway, 1998); major
77 PST sources include certain species of dinoflagellates belonging to *Alexandrium*
78 (formerly *Gonyaulax*), *Gymnodinium*, and *Pyrodinium* genera (Llewellyn, 2006;
79 Kodama 2010).

80 PST toxins are a large group of extremely potent neurotoxic alkaloids causing
81 paralytic shellfish poisoning (PSP) in humans. Their mode of action involves a
82 reversible and highly specific blocking of ion transport by the sodium channel and
83 thus of the action potential in excitable membranes (nerve, skeletal, and cardiac
84 muscle fibers) that can lead to death by respiratory paralysis (Mons et al., 1998;
85 Lehane, 2000; Llewellyn, 2006; Kodama, 2010). In toxigenic dinoflagellates and
86 filter-feeding bivalves more than 20 structurally related PST derivatives have been
87 identified so far. These molecules are water-soluble and vary widely in their
88 potency or biological activity: carbamate toxins saxitoxin (STX), neosaxitoxin
89 (NEO), and gonyautoxins (GTX) 1, 2, 3, 4) are the most potent while the N-
90 sulfocarbamoyl (B and C) toxins are the least potent; the decarbamoyl (dc) toxins
91 exhibit intermediate specific toxicities (Llewellyn, 2006; Kodama, 2010).

92 Bivalve mollusk species, such as the Pacific oyster *Crassostrea gigas*,
93 accumulate PST toxins in tissues mainly in their digestive tract (Cembella et al.,
94 1994; Bricelj and Shumway, 1998; Lassus et al., 2001, 2004; Haberkorn et al.
95 2010). Several behavioral, physiological, and cell responses have been described
96 in the Pacific oyster as an exposure result to PST-producing algae. The most
97 common responses include reduction of filtration activity and clearance rate,
98 production of pseudo-feces (Shumway 1990; Bardouil et al., 1993; Wildish et al.,
99 1998; Lassus et al., 2000, 2004; Tran et al., 2010), immune system alterations
100 (Guéguen et al., 2003; Hégaret and Wikfors, 2005b), and inflammatory responses
101 such as hemocyte aggregation in organs or diapedesis through epithelia on
102 different tissues principally on digestive organs (Hégaret et al., 2007, 2012;
103 Haberkorn et al., 2010).

104 However, the molecular processes and metabolic pathways involved in *C. gigas*'
105 cellular response to the presence of PST toxins are little known at transcriptional
106 level. Recent studies revealed that the genes involved in oxidative and
107 mitochondrial metabolism, such as catalase, glutathione peroxidase and cytochrome
108 oxidase C, immunity (interleukin 17), and detoxification process (Multidrug
109 resistance protein) were transcriptionally repressed by *Alexandrium minutum*
110 exposure (Mat et al., 2013). Also, changes in expression levels of Cu/Zn-
111 superoxide dismutase, glutathione-S transferase, cytochrome p450,
112 lipopolysaccharide and β -1,3-glucan binding protein (LGBP), and glutamine
113 synthetase have been up regulated on oysters exposed to *G. catenatum* cells
114 (García-Lagunas et al., 2013). Núñez-Acuña et al., (2013) found high differential

115 gene expression levels of superoxide dismutase, catalase, ferritin, and heat-shock
116 protein genes in *Mytilus chilensis* exposed to STX.

117 On the other hand, several studies indicated that marine toxins are genotoxic
118 and may also act as tumor initiators (Wikfors, 2005; Landsberg, 2002; González-
119 Romero et al., 2012). Genotoxic stress triggers a variety of cellular responses,
120 including transcriptional activation of the genes regulating DNA repair, cell cycle
121 arrest, and apoptosis (Mirzayans et al., 2012). González-Romero et al., (2012)
122 reported that chromatin remodeling plays a key role in transcriptional activation of
123 regulatory factors in response to a variety of stress signals. For example, *p53* is a
124 sequence-specific transcription factor playing a major role in the regulation of DNA
125 repair, apoptosis, and cell cycle progression; likewise, gene *p21* (or WAF1)
126 produces a protein involved in cell cycle regulation (Mirzayans et al., 2012).
127 Therefore, the aim of our study was to evaluate the effects on *C. gigas* fed with *G.*
128 *catenatum* a PST producer. To assess the impacts of cells containing PST
129 (dinoflagellate), histopathology characterization of the digestive gland and muscle
130 was performed to be used as morphological biomarkers because of the importance
131 of both the digestive gland as the major organ of toxin bioaccumulation and the
132 abductor-muscle on the feeding process (opening and closing of the valves). Also,
133 changes in the transcription rate of the genes involved in cell cycle regulation (*p21*,
134 *p53*, *CAFP55*, *EF2*), inflammatory process (*CASP 1*), and cytoskeleton (*ACT* and
135 *TUB β*) during different times of exposure were evaluated to observe the genotoxic
136 effect as a general damage indicator in oysters.

137

138 2. Materials and methods

139 2.1. *Microalga cultivation*

140

141 The planktonic dinoflagellate *G. catenatum* GCCV 6, which produces saxitoxin
142 (STX), and four of its analogues (dcSTX, GTX2,3, NEO, and GTX1,4) (Perez-
143 Linares et al., 2009; Band-Schmidt et al., 2010) were obtained from the microalgal
144 collection of Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, Baja
145 California Sur (BCS), México. Cultures were grown on modified f/2 medium
146 (Guillard, 1975) in Fernbach flasks and were maintained at 24°C±1°C, 12 h:12 h
147 light/dark, and 150 µmol photons m⁻² s⁻¹ light intensity. For the bioassays, cells
148 were harvested during the late exponential growth phase by centrifuging at 2500 x
149 g, 10 min 19 days after inoculation (Band-Schmidt et al., 2005). Culture-cell density
150 was determined by counting in Sedgwick-Rafter chambers after cell fixation with
151 Lugol's solution (Gifford and Caron, 2000) under an optical microscope (Olympus
152 BX41, Tokyo, Japan). The *Isochrysis galbana* strain ISG-1 provided by CIBNOR's
153 Live Food Laboratory was grown in plastic bags under the same conditions as the
154 dinoflagellates.

155

156 2.2. *Oysters*

157 Diploid juvenile individuals of Pacific oysters (3 ± 1.5 mm, 0.022 ± 0.008 g) were
158 obtained from the hatchery "Acuacultura Robles" in Bahía Magdalena (Las
159 Botellas), BCS, Mexico. Before the bioassay, the bivalves were acclimatized in
160 aerated 0.22 µm filtered seawater at 23 °C and a salinity of 35 for 15 days. The
161 organisms were divided into groups and kept in plastic aquariums (20 L) with

162 filtered seawater (34 ± 1.0 of salinity, 24 ± 1.0 °C) and constant aeration. Oysters
163 were maintained in the conditions mentioned above for acclimation for 10 days and
164 fed daily using *I. galbana* with quantities according with the tables reported for the
165 age (Helm and Bourne, 2004).

166

167 2.3. Experimental design

168 The bioassay consisted on *C. gigas* exposure to two concentrations of *G.*
169 *catenatum* (3 and 30×10^3 cell.mL⁻¹) combined with a fixed amount of *I. galbana*
170 (0.75×10^6 cell.mL⁻¹) feeding per day for 14 days. Two control diets were included:
171 (1) a negative toxin-diet consisting only on *I. galbana* (0.75×10^6 cell.mL⁻¹) to
172 identify both normal behavior and microalga rate-ingest; (2) a positive toxin-diet
173 consisting of only *G. catenatum* (3×10^3 cell.mL⁻¹) to identify the single effect of the
174 toxic dinoflagellate by ingestion and/or starvation. The provided microalgal doses
175 were based on field data observations of HAB events on BCS shores (Sierra-
176 Beltrán, 1998). Groups of 25 oysters (in triplicate) were placed in 100-mL
177 transparent polypropylene containers and exposed to a 1:1 microalgal mixture (v:v,
178 on a final volume of 50 mL). Food (microalgae) was provided once a day as a
179 single dose; aeration was used throughout the experiment to prevent cell
180 sedimentation. Throughout the bioassay, five juvenile oysters of each experimental
181 unit were randomly sampled after 1, 7, and 14 days post-challenge. Sampled
182 organisms in each sample time were replaced by the same number of organisms
183 exposed to *G. catenatum* under the same conditions (mirror bioassay, only for
184 organism replacement). Samples (complete juvenile oysters) were transferred to

185 Eppendorf tubes, washed twice with sterile seawater, and immediately frozen at –
186 80°C until use.

187 *2.4. Histological analysis*

188 Whole unshelled organisms were dehydrated in an ascending ethanol series
189 (70, 80, 95, and 100%), cleared with xylene, and embedded in paraffin. Then, five
190 µm-thick sections were cut using a rotatory microtome (Leica RM 2155 Leica
191 Microsystems, Wetzlar, Germany) and mounted on glass slides. Each slide was
192 stained with Harris hematoxylin for 5 min and counter-stained with eosin-phloxine
193 for 12 min (Martoja and Martoja-Pierson, 1967); stained slides were protected with
194 a cover slip. Slides were examined under a light microscope (Olympus BX50,
195 Tokyo, Japan) to determine tissue injuries (Howard and Smith 1983).
196 Quantification of injuries was measured as the occupation of the tissue relative to
197 the total surface in controls and treatments and determined with image analysis
198 software (Image-pro Instrument).

199

200 *2.5. Total RNA preparation and first strand cDNA synthesis*

201 Total RNA was extracted with TRIzol® (Invitrogen, USA) according to the
202 manufacturer's instructions. Samples were homogenized using a glass pestle;
203 later, two consecutive extractions of each sample were made. RNA purity and
204 quantity were determined by spectrophotometry (NanoDrop ND-2000, Thermo
205 Scientific) by OD 260/280 and OD 260/230 absorbance ratios (range, 1.90–2.08).
206 To ensure complete DNA absence, a direct PCR was performed, using 1 µL (100

207 ng) of each RNA preparation with 28S ribosomal specific primers as a non-
208 amplified control. After that, 0.5 µg were used from each verified RNA sample for
209 cDNA synthesis using the First-Strand cDNA Synthesis Reaction (Invitrogen), for
210 which total RNA was reverse-transcribed using oligo-dT stored at -80°C until used.

211 *2.6. Real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-* 212 *PCR)*

213 A series of standard curve amplifications of primers of candidate reference
214 genes (28S ribosomal RNA, GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate
215 dehydrogenase), *EF1-α* (elongation factor-1α), *ACT* and *TUB β*, and target genes
216 (*CAFP55*, *EF2*, *p21*, *p53*, *CASP 1*) were generated using serial dilutions (1:5) of
217 cDNA obtained from oysters exposed to PST and appropriate controls (Table 1).
218 PCR conditions were 95°C (5 min), 40 cycles of 95°C (60 s), 61°C (30 s), and 72°C
219 (5 s) acquiring fluorescence at 79°C (1s). At the end, a dissociation step from 65°C
220 to 95°C (1°C/s) was performed. The melting curve analysis of amplification
221 products was performed at the end of each PCR reaction to confirm that only one
222 PCR product was amplified and detected.

223

224 *2.7. Statistical analysis*

225 The relative amount of gene transcripts were calculated according to the $2^{-\Delta\Delta Ct}$
226 algorithm and were normalized accordingly to the criteria of Livak and Schmittgen
227 (2001), considering the two most stable genes (28S and *GAPDH*) selected by
228 geNorm (Vandesompele et al., 2002), Normfinder (Andersen et al. 2004), and
229 BestKeeper (Pfaffl et al. 2004) of a group of five housekeeping genes. Expression

230 data were analyzed using a normality test; homogeneity of the variances was
231 verified by Leven's test. Comparisons of the gene expression were determined by
232 one-way ANOVA; significant differences were analyzed with the Fisher's multiple
233 test comparison ($\alpha = 0.01$). All analyses were performed with Statistica 7 software
234 (StatSoft, Tulsa, OK). Significant differences were set at $p < 0.05$.

235

236 **3. Results**

237 *3.1. Histopathology of juvenile oysters*

238 Our results showed that all oysters filtered and ingested both microalgae in the
239 bioassay, but those exposed to *G. catenatum* showed an inflammatory response
240 consisting of hemocyte degranulation and diapedesis into the digestive gland
241 tubules as well as on other tissues such as gills, mantle, and gonadal follicles (data
242 no shown). Figure 1 shows the effect of treatments on the morphology of the
243 digestive gland. Panel 1A shows the normal morphology of the digestive gland
244 tubules of oysters fed with *I. galbana* (toxin negative-control); a healthy columnar
245 epithelium and star-shaped lumen are evident, indicating a normal-feeding activity
246 in oysters. In contrast, Panels 1B-D show the effect of *G. catenatum* on the
247 morphology of digestive gland tubules. Feeding with only *G. catenatum* caused cell
248 epithelium to be thinned, which might indicate mild starvation (Fig 1B). In the case
249 of mixed diets (figures 1C and D), the epithelium of the digestive gland tubules
250 suffered severe thinning as well as major lumen dilatation when oysters were
251 exposed to high concentrations of *G. catenatum* ($30 \times 10^3 \text{ cell.mL}^{-1}$), showing
252 around 70% of tissue damage (Fig. 2A). The organisms exposed to $3 \times 10^3 \text{ cell.mL}^{-1}$

253 ¹ of *G. catenatum* (Fig. 1B) showed 50% of tissue damage (Fig. 2A), while a
254 detachment of epithelial cells into the lumen of tubules was observed.

255 Changes in tissue structure of the adductor muscle were observed when oysters
256 were exposed to *G. catenatum*, showing a severe atrophy characterized by the
257 substantial reduction in cell size when compared with the same tissues from those
258 not exposed to dinoflagellates (Fig. 3). The major loss percentage of muscle mass
259 and presence of abnormal cells were observed in oysters fed with the mixed diet of
260 *G. catenatum* (30×10^3 cell.mL⁻¹) (Fig. 3D) affecting 60% of tissue (Fig. 2B).
261 Oysters fed only with *G. catenatum* (positive toxin-control) (Fig. 2B) showed 40%
262 of affected tissue (Fig. 3B) while those fed only with the microalgae *I. galbana* did
263 not show visible alterations (Fig. 2B and 3A).

264 In addition, oysters exposed to toxic dinoflagellate cells showed immediate
265 behavioral changes after consuming *G. catenatum*, such as partial shell-valve
266 closure and production of pseudofeces (pre-ingestive mechanism which prevents
267 exceeding ingestive capacity facilitating the process of particle selection and
268 mucus production (data not shown). During the 24-h post-feeding with *I. galbana*,
269 the oysters ingested nearly 100% of food while (in the same time period) those fed
270 the dinoflagellate only consumed around 83% (Fig. 4). In the case of mixed diets (*I.*
271 *galbana-G. catenatum*) the oysters exposed to the 3×10^3 cell.mL⁻¹ *G. catenatum*
272 treatment ingested 90% of *I. galbana* and 82% of dinoflagellate, but on the case of
273 dinoflagellate at 30×10^3 cell.mL⁻¹, the oysters ate the same proportion of both
274 algae (60%) (Fig. 4); no mortality of oysters was observed on any treatment.

275

276 3.2. Gene expression analysis by quantitative RT-qPCR

277 As shown in Figure 5, experimental groups exposed to *G. catenatum* cells
278 showed higher expression levels on almost all genes tested than those of control
279 groups. The highest transcript level of *CAFp55* in oysters was observed on day 7 in
280 all treatments challenged with *G. catenatum*; however, transcription decreased to
281 basal values at day 14 of exposure (Fig. 5A). A significant increase of *p21* relative
282 expression ($p \leq 0.05$) was observed from 24 h of exposure to the dinoflagellate in
283 all treatments (Fig. 5B), but the highest expression level was observed in the
284 treatment with $30 \times 10^3 \text{ cells.mL}^{-1}$ at day 7. A decrease in expression was observed
285 in the treatments with the lowest cell concentration at day 14, but *p21* expression
286 significantly increased (8 fold) in the mixed diet with $30 \times 10^3 \text{ cell.mL}^{-1}$ of
287 *G. catenatum* (Fig. 5B). For the genes *EF2* and *p53* after a short-term exposure (24
288 h), the mRNA levels were 2.5 to 3.5 times higher in the groups treated with *G.*
289 *catenatum* than in those of the control group. These differences increased up to 6
290 times after 7 days of exposure although significant differences ($p \leq 0.05$) could still
291 be observed in control (figure 5 C and D). The decrease on the *p53* expression
292 was significantly below the expression level of untreated oysters. We found that the
293 *CASP 1* gene expression level did not change after 24-h exposure, but it increased
294 significantly in all treatments after 7 days, reaching basal level after 14 days of
295 dinoflagellate exposure (Fig. 6A). In our research, changes in expression of the
296 genes involved with cytoskeleton arrangements were identified as induced by *C.*
297 *gigas* exposure to *G. catenatum*. We observed a significant increase in *ACT*
298 expression throughout the experiment (Fig. 6B); however, *TUB β* transcription level

299 did not increase significantly compared with other genes analyzed in the same
300 experiment (Fig. 6C).

301 The results in our study showed the analyzed genes exhibited a constitutive
302 expression under normal conditions (unchallenged oysters) but inducible under the
303 conditions tested (oysters exposed to *G. catenatum*). On the other hand, it is
304 important to emphasize that these changes in the level of expression of the studied
305 genes are dependent on exposure time and the dinoflagellate cell concentration
306 tested.

307

308 **4. Discussion**

309

310 *4.1 Histopathology of oyster spat*

311 As it was demonstrated in figures 1 and 4, comparisons between oysters fed
312 with *G. catenatum* diet and those based on *I. galbana* (known to be a nutritious
313 microalga, negative control) allowed us to confirm that oysters ate actively and fed
314 on both microalgae. Histological observations showed that oysters fed with *I.*
315 *galbana* digested the microalga based upon the star-shaped lumen in the digestive
316 tubules while oysters fed with mixed diet (*G. catenatum* 3×10^3 cell mL⁻¹) and
317 positive control (only *G. catenatum*) digested microalgal cells partially. However, a
318 higher amount of *G. catenatum* (30×10^3 cell mL⁻¹) in a mixed diet promoted
319 epithelium deformation (thin) mainly on the digestive gland tubules as well as
320 hemocyte infiltration and even disintegration of epithelial tissue with the
321 consequence of no digestion of microalgae (some cells were observed intact in the
322 digestive system, data not shown). Presence of intact harmful-algal cells and cyst

323 formation in the digestive system of exposed bivalves has already been observed
324 by several authors (Persson et al., 2006; Laabir et al., 2007; Hégaret et al., 2007,
325 2009; Galimany et al., 2008; Haberkon et al., 2010). In our work, tissue
326 inflammation observed in the experimental group (exposed to *G. catenatum*) may
327 be explained because hemocytes migrate into the lumina of digestive organs in
328 order to remove toxins and to protect tissues from toxicity, as a neutralizing
329 response to damage. Some authors suggest that hemocyte migration by
330 diapedesis across intestine epithelia can be considered as a detoxification pathway
331 (Hégaret et al., 2008, 2009; Haberkon et al., 2010). Additionally, in our study
332 changes were observed in the adductor muscle structure: oysters exposed to *G.*
333 *catenatum* showed muscle atrophy (characterized by the substantial reduction in
334 muscle mass), apparently caused by contraction of muscle fibers and loss of cell
335 mass, mainly in striated muscle (Figure 3B, C, D). Oysters fed *I. galbana* did not
336 show visible tissue alteration. The degeneration of the muscle, changes in the
337 structure and activity have been previously reported in bivalves exposed to PSP-
338 producing dinoflagellates (Hegaret et al., 2007, 2009; Tran et al., 2010). Haberkorn
339 et al. (2010) reported that adductor muscles of Pacific oyster exposed to *A.*
340 *minutum* were intensely affected by myopathy: hyaline and wavy-pattern
341 degeneration; while other authors reported that myo-degeneration of muscle tissue
342 might be associated with muscle paralysis observed during *Alexandrium* exposure
343 in *C. virginica* (Hégaret et al., 2007), *Mytilus edulis* (Galimany et al., 2008a,
344 Navarro et al., 2010) and *C. gigas* (Tran et al., 2010). Such modifications of muscle
345 structure and activity can possibly affect oyster respiration and nutrition processes,

346 as adductor muscle contraction contributes to maintenance of optimal amplitude of
347 valve opening (Bougrier, 2003). Finally, the abnormal cell growth observed in our
348 study suggest an incidence of neoplasia, characterized as an abnormal mass of
349 tissue caused by cells that are multiplying at a rate higher than normal. Landsberg
350 (2002) reported that bivalves accumulate toxins and develop neoplasia.
351 Our study demonstrates further that exposure to a PST-producing HAB species
352 alter the feeding behavior of a bivalve, causes on tissues injuries principally in
353 digestive gland and muscle alteration.

354

355 *4.2 Specific analysis of differential gene expression for quantitative RT-qPCR*

356 In spite of extensive studies of PST-mediated adverse effects, little information
357 on its effect on gene expression is available, which could contribute to a better
358 understanding of the PST-induced toxicity mechanisms. From the seven studied
359 genes we found that Pacific oysters exhibited an increase in the mRNA level of
360 those involved in cell cycle regulation (*p21*, *CAFP55*, *EF2* and *p53*), inflammatory
361 process (*CASP 1*) and cytoskeleton (*ACT* and *TUB β*) as response to *G.*
362 *catenatum* exposure. These genes were selected by their physiological roles, and
363 because they may be a sensitive tool to detect changes when oysters are exposed
364 to these toxic dinoflagellates. The responses resulted time and dose dependent; in
365 all treatments changes in transcript levels suggest a direct relationship with
366 ingestion of toxic algae. On the other hand, the consideration of a positive control
367 (related to toxin effect, the diet consisting only on *G. catenatum*) on the
368 experimental design confirms the impact of the toxic dinoflagellate on the metabolic

369 pathways involved with the genes analyzed on *C. gigas*. In addition, change
370 magnitude and particular effects could be based on the susceptibility of each gene
371 to the toxins or other components of the toxic dinoflagellate. In a mixed diet with
372 the highest *G. catenatum* concentration (30×10^3 cell mL⁻¹) oysters cannot offset
373 the damage caused by such exposure. The genes involved on cell cycle regulation
374 showed different expression patterns compared to other genes, principally with 3
375 and 30×10^3 cell mL⁻¹. These genes (*p21*, *EF2* and *CAFP55*) were overexpressed
376 principally at day 7.

377 The gene *p21* or WAF1 codifies a protein that functions as a potent cyclin-
378 dependent kinase (CDK) inhibitor binding to and suppressing the activity of CDK2
379 and CDK4 cyclin complexes and thus acting as a regulator of cell cycle
380 progression in G1. The *p53* tumor suppressor protein tightly controls *p21*
381 expression by which it mediates the G1 phase-arrest *p53*-dependent cell cycle in
382 response to a variety of stress stimuli (Farcy et al., 2008b; Böttger et al., 2008;
383 Mirzayans et al., 2012). Due to this response, change in *p21* and *p53* gene
384 expression levels was examined in all treatments as a growth arrest pathway
385 marker. The *p53* gene expression was up-regulated principally after 7 days of
386 exposure to the dinoflagellate. The *p53* tumour suppressor gene is considered to
387 be the major sensor of genotoxic stress and the link between DNA damage, cell
388 cycle arrest, and apoptosis (Mirzayans et al., 2012). In addition, we observed an
389 increase in *p21* transcript level, probably due to genotoxic damage in oysters
390 exposed to the toxic cells of *G. catenatum*, suggesting that cell cycle arrest in the
391 oyster by transcriptional activation of *p21* functions to prevent replication of

392 damaged cells. In consequence, these cells might be eliminated by apoptosis, thus
393 this process could be the cause of death of organisms under subchronic exposure
394 to toxic dinoflagellates.

395 *CAFp55* is a histone chaperone protein that plays a critical role in chromatin
396 acetylation, assembly, and maturation coupled to DNA replication and repair
397 (Taylor-Harding et al., 2004). It consists of three different subunits of a molecular
398 size of 55, 60, and 150 kDa, from which the 55 kDa subunit is a component of
399 several protein complexes involved in chromatin remodeling (Taylor-Harding et al.,
400 2004). In our study we found that the transcript level reached a maximum after a 7-
401 day exposure to treatment with the highest toxic dinoflagellate concentration. The
402 expression level increase of the *CAFp55* gene is closely related to an increased
403 expression of *p21* and *p53* (observed on dinoflagellate treatments) since the three
404 genes are indispensable on cellular replication and DNA repair mechanisms. The
405 regulatory role of the assembly factors (as *CAFp55*) in the establishment of these
406 chromatin states and their inheritance through cell cycle and development needs to
407 be explored further. The high transcript levels of these genes found in oysters
408 exposed to diets consisting on low dinoflagellate concentration suggest no DNA
409 damage induction at checkpoints, making it possible to reach equilibrium.
410 However, it did not happen in *C. gigas* exposed to high concentration of toxic cells
411 (30×10^3 cell mL⁻¹), where we assume that alteration of cell cycle control points
412 caused cell death since observed tissue injuries were severe.

413 EF 2 or translocase from the GTPase family is an enzyme that participates on
414 elongation process on protein synthesis. In our work, high transcript levels were

415 observed starting from the first day of exposure to the toxic dinoflagellate. Previous
416 studies have documented that the transcription factors are the first to respond to
417 neurotoxin exposure from diatoms (Salierno et al., 2006; Lefebvre et al., 2009).
418 The *CASP 1* gene that plays a critical role in the execution of inflammation process
419 leading to apoptosis (Sokolova, 2009) was also up-regulated in all treatments at
420 day 7. Therefore, the tissue damage and hemolytic infiltration observed in oysters
421 fed with *G. cantenatum* (PST producer) could be involved in the regulation of
422 inflammatory response.

423 The *ACT* gene is involved in the development of filaments that are the major
424 components of the cytoskeleton. This cellular support structure is a dynamic
425 network of actin polymers and a variety of associated proteins involved in important
426 cellular functions. *ACT* is often used as a constitutive gene; however, in our study
427 we observed a clear expression modulation related to treatments as well as to
428 exposure time (Fig. 5 A). This behavior may be due to the stressful situation in
429 oysters generated by the dinoflagellate, promoting compensation in them by
430 changing cellular levels through cytoskeletal rearrangements, and affecting gene
431 expression level. Lacoste (2001) reported adjustments on the cytoskeleton by
432 stressors such as metals and temperature. In previous studies, the effect of
433 *Perkinsus marinus* (a parasite) on the host cytoskeleton has been clearly
434 demonstrated (Gruenheid and Finlay, 2003). Tanguy and Ford (2004) reported up-
435 regulation of the *ACT* and *TUB* genes involved in cytoskeleton structure in the
436 eastern oyster *Crassostrea virginica* and also in *C. gigas* exposed to *P. marinus*.

437 In the same manner, *TUB* is a main component of the cytoskeleton. The
438 microtubules are involved in various cellular processes including movement of
439 secretory vesicles, organelles, intracellular transport of substances, and cell
440 division (mitosis and meiosis). The high expression of this gene might be
441 associated with generated stress, causing an increase on the synthesis of several
442 intracellular molecules thus augmenting transport through the cells to try to
443 compensate it. Our results suggest that the *TUB* β gene could play an important
444 but not yet identified role on rearrangements of cellular processes in oysters fed
445 with a PST producer dinoflagellate.

446 Paralyzing toxins are heat-stable and highly hydrophilic molecules, acting
447 specifically on nerve cells blocking sodium voltage-gated channels. Because of
448 their hydrophilic characteristic, they do not allow any molecule to cross through the
449 cell membrane by binding site 1 and blocking reversibly the sodium channel pore.
450 Since PSP toxins are unable to enter the cell, they cannot act directly; thus the *G.*
451 *catenatum* exposure effects observed in oysters could occur as an extracellular
452 signal of phosphorylation regulation of some proteins found in their cell membrane,
453 which in turn activate second messengers, causing a cascade of cellular
454 responses by altering gene expression levels.

455

456

457

458

459

460 **5. Conclusions**

461 The histological analysis of *C. gigas* fed with PST producer *G. catenatum*
462 showed important damage in the tissues, as degradation of digestive gland tubules
463 and loss of muscle mass. A modulated gene expression of the genes (*CAFP55*,
464 *p21*, *p53*, *EF2*, *ACT*, and *TUB β*) in our study was found in *C. gigas*, which was
465 dependent on concentration and exposure time to *G. catenatum*. Finally, we
466 suggest that ingestion of *G. catenatum* cells appears to cause DNA damage by
467 altering homeostasis, in particular on cell cycle regulation and inflammatory
468 process genes. In addition, changes in cytoskeleton arrangement could cause
469 diminished health to the oyster and increase its susceptibility to diseases.

470

471 **Acknowledgments**

472 The authors thank CIBNOR staff A. Sierra-Beltrán for technical assistance; A.
473 Greene-Yee, C. Aldana-Avilés, M. Virgen-Félix, and J. Garzón-Favela for their help
474 in the culture of microalgae; M. Moreno for statistical support and D. Dorantes for
475 editorial services. The study was funded by Consejo Nacional de Ciencia y
476 Tecnología (CONACyT Project CB07 No. 083442). N.G.L. is a recipient of a
477 CONACyT fellowship (#083442).

478

479

480

481

482

483

484

485

486

487 **References**

488

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

493

494 Band-Schmidt, C.J., Bustillos-Guzmán, J., Gárate-Lizárraga I., Lechuga-Devéze
495 C.H., Reinhart, K., 2005. Paralytic shellfish toxin profile in strains of
496 dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham and the scallop *Argopecten*
497 *ventricosus* G-B. Sowerby II from Bahía Concepción. Gulf of California México.
498 *Harmful Algae* 4, 21–31.

499

500 Band-Schmidt, C.J., Bustillos-Guzmán, J.J., López-Cortés, D.J., Gárate-Lizárraga,
501 I., Núñez-Vázquez, E.J., 2010. Ecological and physiological studies of
502 *Gymnodinium catenatum* in the Mexican Pacific: a review. *Marine drugs* 8,
503 1935–1961.

504

505 Bardouil, M., Bohec, M., Cormerais, M., Bougrier, S., Lassus, P., 1993.
506 Experimental study of the effects of a toxic microalgal diet on feeding of the
507 oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *Journal of Shellfish Research* 12, 417–422.

508

509 Böttger, S., Jerszyk, E., Low, B., Walker, C., 2008. Genotoxic stress-induced
510 expression of p53 and apoptosis in leukemic clam hemocytes with
cytoplasmically sequestered p53. *Cancer Research* 68, 777–82.

511

512 Bougrier, S., 2003. Paralytic shellfish poison accumulation yields and feeding time
513 activity in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and king scallop (*Pecten*
maximus). *Aquatic Living Resource* 16, 347–352.

514

515 Bricelj, V.M., Shumway, S.E., 1998. Paralytic shellfish toxins in bivalve mollusks:
516 occurrence, transfer kinetics and biotransformation. *Reviews in Fisheries*
517 *Science* 6, 315–383.

518

519 Cembella, A., John, U., 2006. 17 Molecular Physiology of Toxin Production and
Growth Regulation in Harmful Algae 189.

- 520 Farcy, E., Fleury, C., Lelong, C., Dubos, M.P., Voiseux, C., Fievet, B., Lebel, J.M.,
521 2008b. Molecular cloning of a new member of the p53 family from the Pacific
522 oyster *Crassostrea gigas* and seasonal pattern of its transcriptional expression
523 level. *Marine Environmental Research* 66, 300–308.
- 524
- 525 Gaaney, L.F., Shumway, S.E., 1988. A compendium of the responses of bivalve
526 mollusks to toxic dinoflagellates. *Journal of Shellfish Research* 7, 623–628.
- 527 Galimany, E., Sunila, I., Hegaret, H., Wikfors, G., Ramon, M., 2008. Pathology and
528 immune response of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.) after an exposure to the
529 harmful dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Harmful Algae* 7, 630–638.
- 530
- 531 García-Lagunas, N., Romero-Geraldo, R., Hernández-Saavedra, N.Y., 2013.
532 Genomics Study of the Exposure Effect of *Gymnodinium catenatum*, a
533 Paralyzing Toxin Producer, on *Crassostrea gigas*' Defense System and
534 Detoxification Genes. *PLoS ONE* 8(9), 1-9.
- 535
- 536 Gifford DJ, Caron DA, (2000). Sampling, preservation, enumeration and biomass
537 of marine protozooplankton. In: Harris RP et al. (Eds) ICES Zooplankton
538 methodology manual. Academic Press, London. pp. 193-221.
- 539
- 540 González-Romero, R., Rivera-Casas, C., Fernández-Tajes, J., Ausió, J., Méndez,
541 J., Eirín-López, J.M., 2012. Chromatin specialization in bivalve molluscs: A leap
542 forward for the evaluation of okadaic acid genotoxicity in the marine
543 environment. *Comparative Biochemistry and Physiology part C* 155, 175–181.
- 544
- 545 Gruenheid, S., Finlay, B.B., 2003. Microbial pathogenesis and cytoskeletal
546 function. *Nature* 422 (6933), 775–781.
- 547
- 548 Guenguen, Y., Cadoret J.P., Flament, D., Barreau-Roumiguère, C., Girardot, A.L.,
549 Garnier J., Hoareau, A., Bachère, E., Escoubas, A.. 2003. Immune gene
550 discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the
551 bacteriachallenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene* 303, 139-145.
- 552
- 553 Guillard, R.L.L., Ryther, H., 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine
554 invertebrates. In Smith, W.L. and M.M., Chalg, (Eds) Culture of marine
555 invertebrate animals, Plenum Press, New York. pp. 29-60.
- 556
- 557 Haberkorn, H., Lambert, C., Le Goïc, N., Guéguen, M., Moal, J., Palacios, E.,
558 Lassus, P., Soudant, P., 2010. Effects of *Alexandrium minutum* exposure on
559 physiological and hematological variables of diploid and triploid oysters,
560 *Crassostrea gigas*. *Aquatic Toxicology* 97, 96–108.
- 561
- 562 Hégarret, H., Wikfors, G., 2005. Time-dependent changes in hemocytes of eastern
563 oysters *Crassostrea virginica* and northern bay scallops *Argopecten irradians*
564 *irradians*, exposed to a cultured strain of *Prorocentrum minimum*. *Harmful*
565 *Algae* 4 (2), 187-199.

- 566
567 Hégaret, H., Wikfors, G., Shumway, S., 2007. Diverse feeding responses of five
568 species of bivalve mollusk when exposed to three species of harmful algae.
569 Journal of Shellfish Research 26, 549-559.
570
- 571 Hégaret, H., Wikfors, G., Shumway, S., 2009. Biotoxin contamination and shellfish
572 safety, In: *Shellfish Quality and Safety* (ed. by Shumway, S.E. & G.E. Rodrick).
573 Woodhead Publishing Cambridge, pp. 43-80.
- 574 Hégaret, H., Brokordt, K.B., Gaymer, C.F., Lohrmann, K.B., García, C., Varela, D.,
575 2012. Effects of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* on
576 histopathological and escape responses of the Northern scallop *Argopecten*
577 *purpuratus*. Harmful Algae 18, 74–83.
- 578 Helm, M.M., Bourne, N., Lovatelli, A., 2004. Hatchery culture of bivalves. A
579 practical manual. FAO Fisheries Technical Paper, pp.177.
580
- 581 Howard, D.W., Smith, C.S., 1983. Histological techniques for marine bivalve
582 mollusks. *National Oceanic and Atmospheric Administration*. Technical
583 Memorandum NMFSF/ NEC-25. U.S. Department of Commerce, pp 95.
584
- 585 Kodama, M., 2010. Paralytic Shellfish Poisoning Toxins: Biochemistry and Origin.
586 ABSM 3, 1–38.
- 587 Laabir, M., Amzil, Z., Lassus, P., Masseret, E., Tapilatu, Y., Vargas, R. De,
588 Grzebyk, D., 2007. Viability , growth and toxicity of *Alexandrium catenella* and
589 *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) following ingestion and gut passage in
590 the oyster *Crassostrea gigas*. Aquatic Living Resources 57, 51–57.
- 591 Lacoste A., Jalabert, F., Malham, S., Cueff, A., Gelebart, F., Cordevant, C., Lange,
592 M., Poulay S.A., 2001. A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer
593 mortalities of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix. Diseases
594 of Aquatic Organisms 46, 139-145.
- 595 Landsberg, J.H., 2002. The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms.
596 Reviews in Fisheries Science 10, 113–390.
597
- 598 Lassus, P., Bardouil, M., Masselin, P., Naviner, M. Truquet, P., 2000. Comparative
599 efficiencies of different non-toxic microalgal diets in detoxification of PSP-
600 contaminated oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg). Journal of Natural Toxins
601 9(1), 1-12.
- 602 Lassus, P., Baron, R., Garen, P., Truquet, P., Masselin, P., Bardouil, M., Leguay,
603 D., Amzil, Z., 2004. Paralytic shellfish poison outbreaks in the Penzé estuary □ :

- 604 Environmental factors affecting toxin uptake in the oyster, *Crassostrea gigas*.
605 Aquatic Living Resources 214, 207–214.
- 606 Lehane, L., 2000. Paralytic shellfish poisoning: a review. National Office of Animal
607 and Plant Health, Agriculture, Fisheries and Forestry: Canberra, Australia, pp.
608 56.
- 609 Lefebvre, K.A., Tilton, S.C., Bammler, T.K., Beyer, R.P., Srinouanprachan, S.,
610 Stapleton, P.L. 2009. Gene Expression Profiles in Zebrafish Brain after Acute
611 Exposure to Domoic Acid at Symptomatic and Asymptomatic Doses. System
612 107(1), 65-77.
- 613
- 614 Lesser, P.M., 2006. Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and
615 Physiological Ecology. Annual Review of Physiology 68, 253–78.
- 616
- 617 Llewellyn LE., 2006. Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a
618 multitude of receptors. Natural Products Reports 23(2), 200-22.
- 619
- 620 Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using
621 real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 25
622 (4), 402–408.
- 623
- 624 Martoja, R., Martoja-Pierson, M., Grassé, P.P., 1967. Initiation aux techniques de
625 l'histologie animale. Paris, Masson. pp. 345.
- 626
- 627 Mat, M.A., Haberkorn, H., Bourdineaud P.J., Massabuau, J.C., Tran, D., 2013.
628 Genetic and genotoxic impacts in the oyster *Crassostrea gigas* exposed to the
629 harmful alga *Alexandrium minutum* Aquatic Toxicology 140–141, 458–465.
- 630
- 631 Mirzayans, R., Andrais, B., Scott, A., Murray, D., 2012. New insights into p53
632 signaling and cancer cell response to DNA damage: Implications for cancer
633 therapy. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 1-16
- 634
- 635 Mons, M.N., Van Egmond, H.P. Speijers, G.J.A., 1998. Paralytic shellfish
636 poisoning: A review. RIVM Report 388802 005.
- 637
- 638 Navarro, J.M., Contreras, A.M., 2010. An integrative response by *Mytilus chilensis*
639 to the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. Marine Biology 157, 1967–
640 1974.
- 641
- 642 Nuñez-Acuña, G., Aballay, A.E., Hégaret, H., Astuya, P.A., Gallardo-Escárate, C.,
643 2013. Transcriptional responses of *Mytilus chilensis* exposed *in vivo* to
644 saxitoxin (STX) Journal of Molluscan Studies 79 (4), 323-331.
- 645

- 646 Pérez-Linares, J., Ochoa, J.L., Gago-Martínez, A. 2009. Retention and tissue
647 damage of PSP and NSP toxins in shrimp: Is cultured shrimp a potential vector
648 of toxins to human population. □ *Toxicon*, 53 185–195.
649
- 650 Persson, A., Smith, B.C., Wikfors, G.H., Quilliam, M. 2006. Grazing on toxic
651 *Alexandrium fundyense* resting cysts and vegetative cells by the eastern oyster
652 (*Crassostrea virginica*). *Harmful Algae* 5, 678–684.
- 653 Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T.P., 2004. Determination of
654 stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample
655 integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations.
656 *Biotechnology letters* 26, 509-515.
657
- 658 Salierno, J.D., Snyder, N.S., Murphy, A.Z., Poli, M., Hall, S., Baden, D., 2006.
659 Harmful algal bloom toxins alter c-Fos protein expression in the brain of killifish,
660 *Fundulus heteroclitus*. *Aquatic toxicology* 78(4), 350-7.
661
- 662 Sierra-Beltrán, A.P., Cruz-Villacorta, A., Núñez-Vázquez, E., Del Villar, L.M.,
663 Crerecero, J., Ochoa, J.L. 1998. An overview of the marine food poisoning in
664 Mexico. *Toxicon* 35, 447-453.
665
- 666 Sokolova, I.M., 2009. Apoptosis in molluscan immune defense. *ISJ*. 6 49-58
667
- 668 Shumway, S.E., 1990. A review of the effects of algal blooms on shellfish and
669 aquaculture. *Journal World Aquaculture Society* 2, 65–104.
670
- 671 Tanguy, A., Guo, X., Ford, S.E., 2004. Discovery of genes expressed in response
672 to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific
673 (*C. gigas*) oysters. *Gene* 338, 121-131.
674
- 675 Tran, D., Haberkorn, H., Soudant, P., Ciret, P., Massabuau, J.C., 2010. Behavioral
676 662 responses of *Crassostrea gigas* exposed to the harmful algae *Alexandrium*
677 *minutum*. *Aquaculture* 298 (3-4), 338–345.
678
- 679 Taylor-Harding, B., Binné, U.K., Korenjak, M., Brehm, A., Dyson, N.J., 2004.
680 *Molecular Cell Biology* 24 (20), 9124-36.
681
- 682
- 683 Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., 2002.
684 Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric
685 averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3, 1–12.
686
- 687 Wikfors, G.H., 2005. A review and new analysis of trophic interactions between
688 *Prorocentrum minimum* and clams, scallops and oysters. *Harmful Algae* 4, 585-
689 592.
690

691 Wildish, D., Lassus, P., Martin, J., Saulnier, A. y Bardouil, M. 1998. Effect of the
692 PSP causing dinoflagellate, *Alexandrium* spp. on the initial feeding response of
693 *Crassostrea gigas*. Aquatic Living Resources 11, 35-43.
694

695

696

697

698

699

700

701

702

703

704

705

706

707

708

709

710

711

712

713

714

715

716

717

718

719

720

721

722

Primers	Sequence 5'-3'	Gene name	Amplicon size (pb)	PCR Efficiency	GenBank
Cg- 28S-Fw*	GGAGTCGGGTTGTTTGAGAATGC	<i>Ribosomal subunit 28S</i>	114	1.97	AY632555
Cg- 28S-Rv*	GTTCTTTTCAACTTTCCCTCACGG				
Cg- GAPDH-Fw*	GTTCAAATATGATTCAACTCACGG	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	109	2.0	AB122066
Cg- GAPDH-Rv*	TGGATCCCGTTCGCAATATACG				
Cg-TUB-Fw	AGCAGATGTCGTAGAGAGCTTC	<i>Tubulin β</i>	144	1.96	CB617442
Cg-TUB-Rv	TGAACACATTCTCCGTTGTCCC				
Cg-ACT-Fw	TACTCTTTCACCACCACAGCCG	<i>Actin (GIA)</i>	117	1.95	AF026063
Cg-ACT-Rv	TAGAGATGAGGATGAAGCAGCAG				
Cg- p53-Fw	CTGTAGTTCTGGCCCGTGAA	<i>Tumour suppressor protein p53</i>	110	1.98	AM236465
Cg- p53-Rv	AAACACAAGGGCACCACAAG				
Cg-p21-Fw	TTCCCATTCTCCCATGTTGTTC	<i>Cell cycle regulator p21 protein</i>	100	1.98	CB617437
Cg-p21-Rv	ACAGGCGACATGGATTTAGAAGC				
Cg-CAFp55-Fw	TCGAAGATCCCACAAAGCAACAG	<i>Chromatin assembly factor 1 p55 subunit</i>	77	1.99	CB617555
Cg-CAFp55-Rv	TGTCCTTCAACCCCTACAGCGA				
Cg-EF2-Fw	TTGATCACGGCAAGTCTACTCTG	<i>Elongation factor 2</i>	109	2.0	CB617558
Cg-EF2-Rv	GAGATGGCAGTGGACTTGATGG				

Cg-CASP 1- Fw	ACTACAGAAAGCCGCCGAAT	<i>Caspase 1</i>	108	1.97	HQ425703
Cg-CASP 1- Rv	GATCATTCTGTGCTACCCCC				

724
725

726 **Tables legends**

727 **Table 1.** Primer details of target genes used on real-time PCR analysis and
728 reference genes (*).

729

730

731 **Figures legends**

732

733 **Figure 1.** Abnormal histopathological observations in digestive gland tubules in
734 juvenile oysters exposed to treatments for 14 days: (A) to the “negative control”
735 (fed *I. galbana* only); (B).to the “positive control” (fed *G. catenatum* only); (C)
736 treatment 3×10^3 cell mL⁻¹ (fed *G. catenatum* + *I. galbana*); and (D) treatment $30 \times$
737 10^3 cell mL⁻¹ (fed *G. catenatum* + *I. galbana*).

738

739

740 **Figure 2.** Percentages of abnormal histopathological observations in juvenile
741 oysters exposed to the “*Gymnodinium catenatum*” treatment
742 (fed *G. catenatum* + *I. galbana*), to the “positive control” (fed *G. catenatum* only)
743 and to the “negative control” (fed *I. galbana* only) for 14 days.

744

745 **Figure 3.** Abnormal histopathological observations in muscle of juvenile oysters
746 exposed to: (A) “negative control” (fed *I. galbana* only); (B). “positive control” (fed
747 *G. catenatum* only); (C) treatment 3×10^3 cell mL⁻¹ (fed *G. catenatum* + *I. galbana*);
748 and (D) treatment 30×10^3 cell mL⁻¹ (fed *G. catenatum* + *I. galbana*) for 14 days.

749

750

751 **Figure 4.** Percentage of ingestion of *Gymnodinium catenatum* and/or *Isochrysis*
752 *galbana* cells by *C. gigas* juveniles

753

754

755 **Figure 5.** Quantitative expression (qPCR) of *Crassostrea gigas* target genes at
756 exposure to *Gymnodinium catenatum* and/or *Isochrysis galbana* cells. Each gene
757 expression is shown as relative expression ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) with 28S ribosomal and
758 GAPDH as endogenous controls. Asterisk indicates significant differences between
759 treatments and negative control ($p \leq 0.05$ in Fisher’s HSD).

760

761 **Figure 6.** Quantitative expression (qPCR) of *Crassostrea gigas* target genes at
762 exposure to *Gymnodinium catenatum* and/or *Isochrysis galbana* cells. Each gene
763 expression is shown as relative expression ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) with 28S ribosomal and
764 GAPDH as endogenous controls. Asterisk indicates significant differences between
765 treatments and negative control ($p \leq 0.05$ in Fisher’s HSD).

766

767

Figure 1

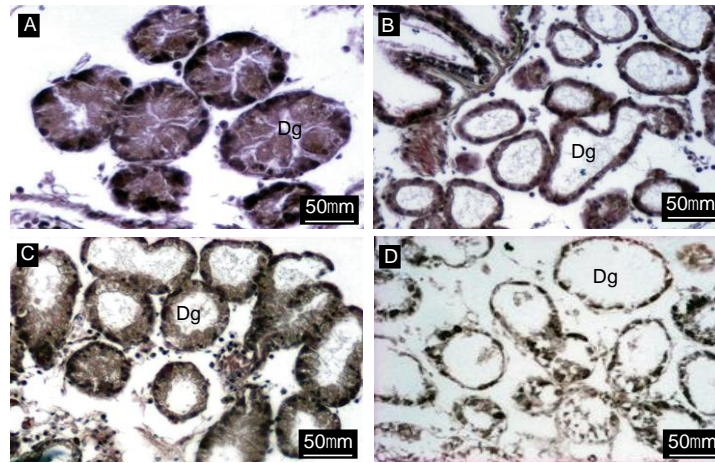


Figure 2

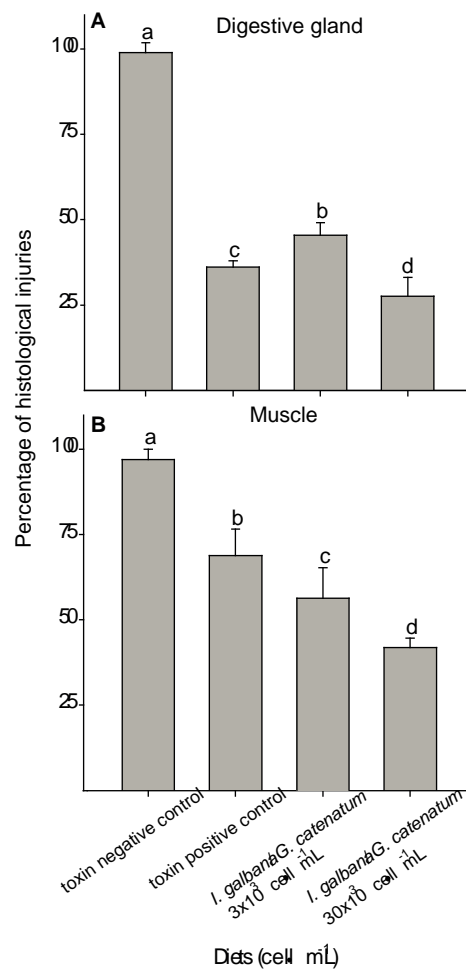


Figure 3

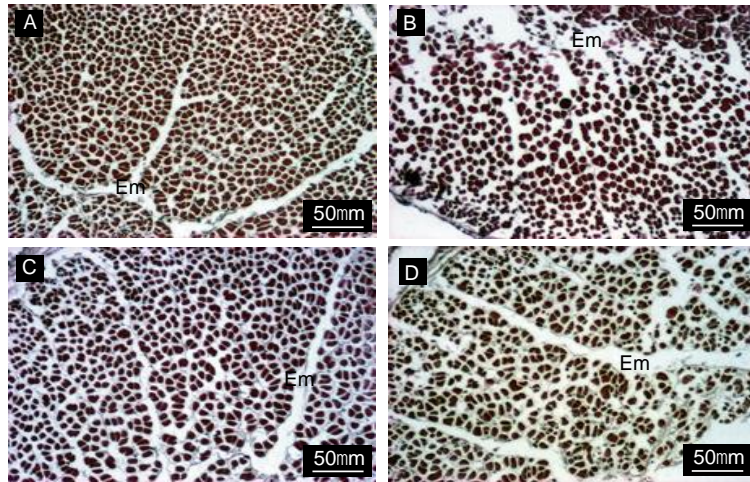


Figure 4

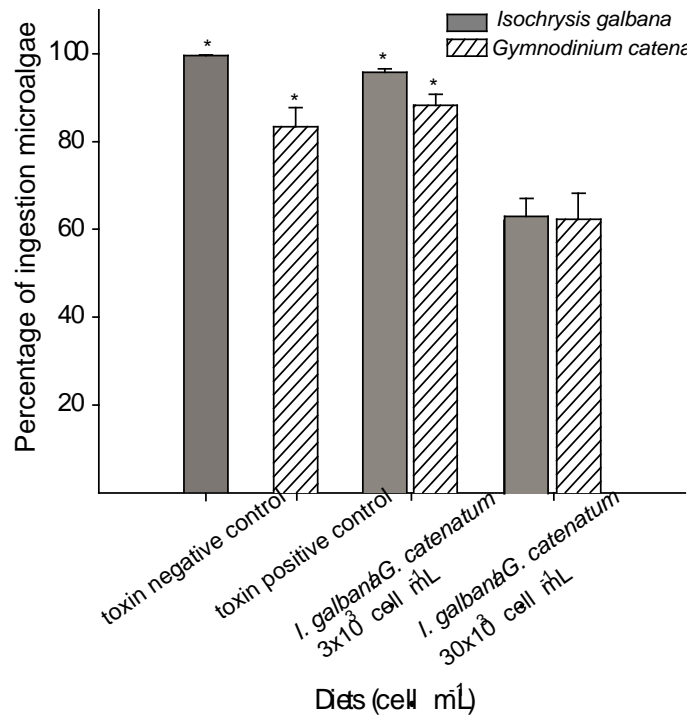


Figure 5

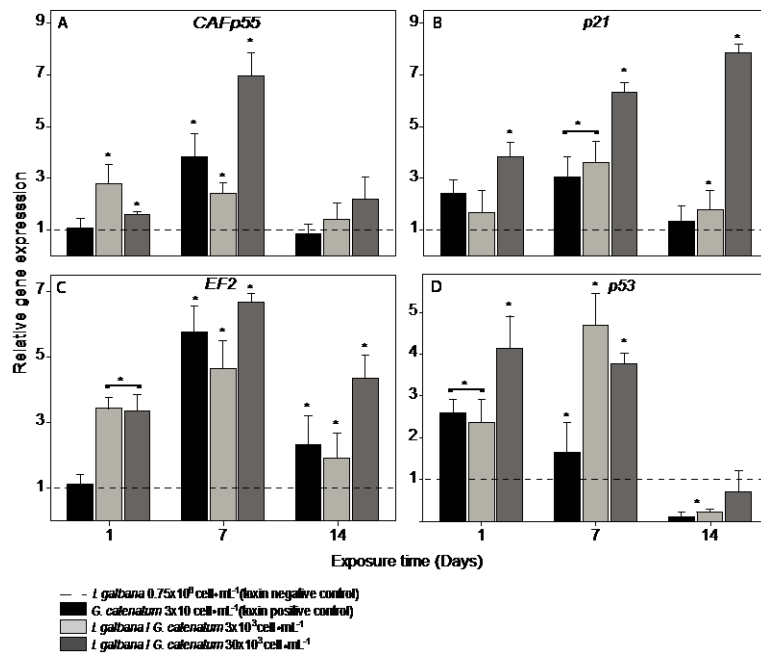


Figure 6

