



Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DOCTORADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Marcadores subcelulares en el ostión
Crassostrea virginica (Gmelin 1879)
de Tampamachoco, Veracruz.

TESIS

Que para obtener el grado de Doctor en Biología
Experimental presenta:

M.B.E. INGRID SUSANA CAMARENA NOVELO

22 de julio de 2019

Esta Tesis se desarrolló en el Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 300050

Este trabajo estuvo incorporado y financiado parcialmente por los proyectos:

Este trabajo fue financiado parcialmente por CONACYT proyecto 0105961 y SEP-CONACYT-ANUIES-ECOS proyecto M10-A02 en colaboración con Francia. Responsable Dra. Reyna Fierro Pastrana.

“Diagnóstico Ambiental de la Laguna de Tampamachoco y Posibles Efectos por la operación de la Central Termoeléctrica Presidente Adolfo López Mateos en la zona de influencia. Segunda Etapa” del Laboratorio de Contaminación Marina, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Responsable Dr. Alfonso Vázquez Botello.

MIEMBROS DEL JURADO

DRA. MARGARITA ZAYIL SALAZAR CAMPOS
Presidenta.

DRA. IRMA JIMÉNEZ MORALES
Secretario.

DRA. SOCORRO SOBRINO FIGUEROA
Vocal.

DR. ROBERTO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
Vocal.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

CODIRECTOR DR. HUMBERTO GONZÁLEZ MÁRQUEZ. Laboratorio de Expresión Génica. Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa.

CODIRECTOR DR. ALFONSO VÁZQUEZ BOTELLO. Laboratorio de Contaminación Marina. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México.

ASESORA DRA. MARGARITA ZAYIL SALAZAR CAMPOS. Laboratorio de Expresión Génica. Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa.

DEDICATORIA

Con todo mi amor a Antonio mi esposo, por su compañía y apoyo incondicionales, por impulsarme a hacer realidad mis sueños soportando con entereza la ausencia que implicó este reto y todos los que me he propuesto.

AGRADECIMIENTOS

A los Doctores Humberto González Márquez, Alfonso Vázquez Botello y Zayil Salazar Campos por las enseñanzas, el valioso tiempo y dedicación que me concedieron en este camino.

A la Dra. Reyna Fierro por su generoso apoyo, valiosos consejos y gran calidad humana.

A mi querida amiga y maestra Dra. Yvonne Ducolomb⁺ a quien extrañaré siempre.

A mi querida amiga Dra. Irma Jiménez Morales por sus consejos y amistad.

A los Drs. Iván Bahena Ocampo y Francisco Alarcón Aguilar por su amistad y apoyo.

A los doctores Anne-Sophie Vercouter, Anne Sophie Lacoste y Tony Lefebvre por haberme aceptado para realizar una estancia de investigación en la Unidad de Glicobiología Estructural y Funcional, UMR CNRS/USTL N° 8576, Villeneuve d'Ascq, Francia.

A mi familia, mi esposo Antonio Carreño, mi Mamá Delia Novelo, mi Papá Mario Camarena; mis hermanos Rebeca y Rubén, mi hijo Carlos, mi sobrina Mariceci y mis nietos Carlitos, Sebastián y Milo, mis primos Maru, Bety y Roberto por su cariño y respaldo incondicional.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.	1
Lagunas Costeras.	2
<i>Zona de estudio</i>	3
Organismos bioindicadores.....	4
Ostión americano (<i>Crassostrea virginica</i>).	5
<i>Anatomía de las branquias</i>	7
Biomarcadores.....	9
Proteínas de estrés HSP.	11
<i>Clasificación de las HSP</i>	12
<i>Regulación de los genes de las HSP70 (Heat shock protein)</i>	13
JUSTIFICACIÓN.	16
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.	17
HIPÓTESIS.	17
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS PARTICULARES.	18
MATERIALES Y MÉTODOS.	19
Trabajo en campo.	19
<i>Caracterización y disección de muestras.</i>	19
<i>Conservación de las muestras.</i>	20
<i>Control positivo (CP)</i>	20
Expresión genética	21
<i>Diseño de cebadores.</i>	21
<i>Extracción de mRNA:</i>	22
<i>Retrotranscripción (RT):</i>	24
<i>Reacción en cadena de polimerasa (PCR).</i>	24
Proteínas.	25
<i>Extracción de proteínas.</i>	25
<i>Cuantificación de proteínas</i>	25
<i>Electroforesis (PAGE).</i>	25
<i>Geles de gradiente</i>	26
Electroforesis bidimensional 2DE	27

Electrotransferencia (Western Blot)	29
Análisis de imágenes.	31
Análisis estadístico.....	31
RESULTADOS.....	32
Parámetros físico-químicos.....	32
<i>Discusión Parámetros Físico-Químicos.....</i>	<i>36</i>
<i>pH.....</i>	<i>36</i>
<i>Oxígeno Disuelto.....</i>	<i>37</i>
<i>Salinidad.....</i>	<i>39</i>
<i>Temperatura.....</i>	<i>40</i>
Ostiones bajo Condiciones Controladas.	40
<i>Discusión Ostiones bajo Condiciones Controladas.....</i>	<i>41</i>
Caracterización de las muestras	41
<i>Discusión de Caracterización de las Muestras.....</i>	<i>42</i>
Expresión genética	42
<i>Discusión Expresión Genética.....</i>	<i>45</i>
PAGE-SDS.....	48
PAGE-SDS con órganos.....	51
<i>Discusión PAGE-SDS.....</i>	<i>53</i>
Inmunodetección de proteínas de Choque térmico de la familia de la HSP70.....	54
<i>Variación estacional de niveles de expresión de HSP.....</i>	<i>55</i>
<i>Discusión Inmunodetección.....</i>	<i>58</i>
Electroforesis Bidimensional (2DE).	61

<i>Perfil de Expresión de Proteínas</i>	63
<i>Spots 1 a 5</i>	75
<i>Intensidad Relativa</i>	75
<i>Masa Molecular</i>	75
<i>Punto Isoeléctrico</i>	76
<i>SPOTS 5.1 A 5.4</i>	78
<i>Intensidad Relativa</i>	78
<i>Masa Molecular</i>	78
<i>Punto Isoeléctrico</i>	79
<i>SPOTS independientes</i>	79
<i>Discusión Electroforesis Bidimensional</i>	80
DISCUSIÓN GENERAL	87
CONCLUSIONES	96
PERSPECTIVAS	98
BIBLIOGRAFÍA	99
ARTÍCULO	107

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Laguna Tampamachoco. Estaciones geográficas en las que se tomaron muestras de agua para determinar parámetro físico-químicos.	4
Figura 2. Anatomía del ostión: se distinguen el esófago, la glándula digestiva, el estómago, los intestinos ascendente y descendente, el saco del estilete, el estómago, el recto, el ano, la cámara cloacal, el manto con cilios sensores y las branquias (Imagen modificada de (Ruppert y Barnes, 1996).	7
Figura 3. Gráfica de pH para las estaciones Secas (2013), Nortes (2014) y Nortes (2016). Se observa una acidificación durante ambas épocas de nortes con relación al primer muestreo, siendo más ácida la época de Nortes (2016)....	34
Figura 4. Gráfica de temperatura para las estaciones Secas (2013), Nortes (2014) y Nortes (2016). La época de Secas muestra una temperatura mayor con 7°C de diferencia con las épocas de Nortes en que ambas se mantuvieron entre 19 y 20°C.	34
Figura 5. Gráfica de salinidad (UPS) para las estaciones Secas (2013), Nortes (2014) y Nortes (2016). La salinidad se mantuvo constante en todas las épocas de recolecta, con algunas diferencias entre estaciones geográficas.	35

Figura 6. Gráfica de Oxígeno Disuelto (mg/L) para las estaciones Secas (2013), Nortes (2014) y Nortes (2016). Se observa mayor concentración de oxígeno disuelto en época de secas.....	35
Figura 7. Amplificación de genes de Hsp70 y de β -Actina de muestras de manto de ostiones de Tampamachoco. Marcador de peso molecular: carriles 1 y 8. Amplificación de Hsp70: carriles 2, 3, y 4. Amplificación de β -Actina: carriles 5, 6 y 7. Laguna, Control negativo y Cooperativa, respectivamente.	43
Figura 8. Gráficas de Unidades de Intensidad Relativa de la expresión de los Genes de Actina y Hsp70 en ostiones (Control Negativo, Cooperativa y Laguna Tampamachoco).	45
Figura 9. Patrón electroforético de branquias de proteínas solubles totales de individuos de <i>C. virginica</i> . La primera línea representa el marcador de pesos molecular. Cada línea representa el patrón electroforético representativo de un individuo.	48
Figura 10. Patrón electroforético de branquias de proteínas solubles totales de grupos de cinco individuos de <i>C. virginica</i> . La primera línea representa el marcador de pesos molecular. Cada línea representa el patrón electroforético representativo de un grupo de cinco individuos.	49
Figura 11. SDS-PAGE de tres diferentes órganos de grupos de ostiones recolectados en la época de Nortes 2016.	51
Figura 12. Comparativo de muestras de órganos de ostiones recolectados en la época de Nortes 2016.	52
Figura 13. Inmunodetección de proteínas de estrés HSP-70 en branquias de ostiones recolectados en épocas de secas 2013, nortes 2014 y Control Positivo. En las muestras individuales de los ostiones de la época de secas (A) se expresaron las isoformas HSP-73, HSP-72 y HSP-69, mientras que en época de nortes (B) y Control Positivo (C) la isoforma HSP-69 estuvo ausente. En muestras agrupadas para las mismas condiciones se observan los mismos resultados (D).....	55
Figura 14. Representación gráfica del análisis semi-cuantitativo de la expresión de la isoforma HSP-73. Se observan muestras individuales y agrupadas de las épocas de secas, nortes y CP.....	56
Figura 15. Representación gráfica del análisis semi-cuantitativo de la expresión de la isoforma HSP-72. Se observan muestras individuales y agrupadas de las épocas de secas, nortes y CP.....	57
Figura 16. Representación gráfica del análisis semi-cuantitativo de la expresión de la isoforma HSP-69. Se observan muestras individuales y agrupadas de las épocas de secas, nortes y CP.....	58

Figura 17. Estandarización de 2DE de proteínas totales de branquia de ostión recolectado en época de Nortes 2014, con gel IPG de intervalo de pH de 4-7 y masa Molecular de 250-25kDa.	62
Figura 18. Gel 2DE representativo de branquia de ostiones recolectados en la Laguna Tampamachoco en la época de Nortes 2014.....	63
Figura 19. Gel 2DE representativo de ostiones recolectados en la Laguna Tampamachoco en la época de Secas 2013.	64
Figura 20. Gel 2DE representativo de ostiones recolectados en la Laguna Mandinga en la época de Lluvias 2014.....	65
Figura 21. Gel 2DE representativo de ostiones recolectados en la Laguna Alvarado en la época de Secas 2014.....	66
Figura 22. Gel 2DE representativo de ostiones Control Positivo en condiciones controladas de laboratorio.....	67
Figura 23. Gel 2DE representativo de ostiones Control Negativo en condiciones controladas de laboratorio.....	68
Figura 24. Representación de Unidades de Intensidad Relativa de los spots 1 a 5 de branquia de ostión de las Lagunas Tampamachoco (Nortes y Secas); Mandinga (lluvias); Alvarado (lluvias); Controles (Positivo y Negativo). ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 26. Masa molecular de los spots 1 a 5 de branquia de ostión de las Lagunas Tampamachoco (Nortes, Secas); Mandinga (lluvias); Alvarado (lluvias); Controles (Positivo y Negativo).....	76
Figura 27. Representación gráfica del Punto Isoeléctrico (Unidades de Intensidad Relativa) calculado a partir del gel 2DE de muestras de branquia de las Lagunas Tampamachoco (Nortes, Secas), Mandinga (lluvias), Alvarado (lluvias) y Controles Positivo y Negativo.	77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las proteínas de la familia de las HSP.	12
Tabla 2. Secuencia de cebadores y características de productos utilizados para extracción de fragmentos de genes utilizados para PCR.....	22

Tabla 3. Ubicación de estaciones geográficas (latitud y longitud) dentro del Sistema estuarino-lagunar Tuxpam-Tampamachoco.....	32
Tabla 4. Parámetros físico-químicos medidos en las estaciones de Secas (2013), Nortes (2014) y Nortes (2016).....	33
Tabla 5. Rendimiento de RNA en tejido de ostiones de la época de Secas, COO y Control negativo.	43
Tabla 6. Expresión de los genes de Actina y Hsp70 en ostiones del Control Negativo, Cooperativa y Laguna de Tampamachoco.	44
Tabla 7. Relación de la expresión Hsp70/Actina en muestras de manto de ostión del Control Negativo, Cooperativa y Laguna Tampamachoco.	45
Tabla 8. Bandas observadas en la PAGE de muestras individuales y agrupadas de proteínas solubles totales de branquia de ostión.	50
Tabla 9. Comparativo de patrón electroforético de proteínas solubles totales observadas en tejidos de Glándula Digestiva, Branquia y Manto de ostiones recolectados en la época de Nortes 2016.	52
Tabla 10. Proteínas localizadas en las muestras de branquia de ostión de las Lagunas Tampamachoco (Nortes, Secas); Mandinga (lluvias); Alvarado (lluvias); Controles (Positivo y Negativo).....	69
Tabla 11. Relación de coincidencias entre la expresión de las muestras de branquia de ostión de las Lagunas Tampamachoco (Nortes, Secas); Mandinga (lluvias); Alvarado (lluvias); Controles (Positivo y Negativo).....	73
Tabla 12. Proteínas expresadas de manera particular en las muestras de branquia de ostión analizadas por 2DE.	74

Tabla 13. Comparativo de mM, pl e IR de los Spots del 1 al 5 de muestras de branquia de ostión de la Laguna Tampamachoco (Secas y Nortes) Laguna Mandinga, Laguna Alvarado, Control Positivo y Control Negativo.	77
Tabla 14. Comparativo de mM, pl e IR de los Spots del 5.1 al 5.3 de muestras de branquia de ostión de la Laguna Tampamachoco (Secas y Nortes) Laguna Mandinga y Laguna Alvarado.....	79
Tabla 15. Spots expresados independientemente en las muestras de Alvarado, Secas y Control Negativo.....	79
Tabla 16. Proteínas que pueden ser semejantes entre <i>C. gigas</i> y <i>C. virginica</i>	86

RESUMEN

Las proteínas HSP70 se utilizan como biomarcadores de exposición y el ostión *Crassostrea virginica* es considerado como un organismo bioindicador en evaluaciones ambientales. De acuerdo con la estación, el nivel de expresión de la familia de las HSP70 en ostiones silvestres no ha sido caracterizado. Se colectaron noventa muestras de ostión en un sitio dentro de la Laguna Tampamachoco durante las estaciones de secas y “nortes”. Un grupo se mantuvo bajo condiciones de laboratorio y expuesto a estrés térmico. El pH, la temperatura, la salinidad y el oxígeno disuelto (DO₂) se midieron dentro del sistema salobre Tuxpan-Tampamachoco. La salinidad y el DO₂ estuvieron fuera de los límites recomendados para sistemas salobres en ambas estaciones. El objetivo de este trabajo fue analizar las diferencias en las expresiones genética y proteica como respuestas a estrés en los ostiones de la Laguna Tampamachoco utilizando branquias de *C. virginica* de manera individual y grupal bajo condiciones naturales. La electroforesis y el ensayo de inmunodetección se llevaron a cabo con branquias de ostiones. Las isoformas HSP73, HSP72 y HSP69 se expresaron en tejido de las muestras de la época de secas, mientras que solamente las isoformas HSP73 y HSP72 se detectaron en tejido de las muestras de época de nortes y control positivo. La isoforma HSP73 no ha sido reportada previamente en *C. virginica*. Se evaluaron grupos de ostiones por medio de electroforesis bidimensional encontrando 50 o más proteínas similares, y diferencias significativas en el patrón electroforético, siendo las muestras de Alvarado, Control positivo y Mandinga las más parecidas entre si. Para evaluar la expresión de la familia de las proteínas HSP70 a nivel individual y grupal de organismos silvestres es importante determinar una línea de base de expresión estacional.

Palabras clave: biomarcador, proteínas de estrés, evaluación ambiental, *Crassostrea virginica*.

ABSTRACT

The HSP70 proteins are used as exposure biomarkers, and the oyster *Crasostrea virginica* is considered as a bioindicator organism in environmental assessment. According to the season, the level of expression of the HSP70 family in wild oysters has not been characterized before. Ninety oyster samples were collected at the unpolluted locations from the Tampamachoco Lagoon during the dry and “north winds” seasons. One group of oysters was maintained under laboratory conditions and exposed to thermal stress. The pH, temperature, salinity, and dissolved oxygen (DO₂) were measured inside the brackish Tuxpam-Tampamachoco system. Salinity and DO₂ were outside the limits recommended for brackish systems in both seasons. The aim of this work was to analyze the proteinic and genetic expression differences between seasons as stress response in oysters using *C. virginica* gills from individuals and groups of oysters from the Tampamachoco Lagoon under natural conditions. The electrophoresis and immunodetection assay of HSP70 were performed using proteins from oyster gills. The HSP73, HSP72 and HSP69 isoforms were expressed in dry season tissue samples, while only the HSP73 and HSP72 isoforms were detected in north winds season tissue samples and positive control tissue samples. The HSP73 isoform has not been previously reported in *C. virginica*. Oysters groups were analyzed by two-dimensional electrophoresis founding 50 similar proteins and significant differences in electrophoretic pattern, been Alvarado, Positive Control and Mandinga samples the most similar to each other. To evaluate the expression of HSP70 protein family at individual and group levels from wild animals, it is also important to determine a seasonal baseline expression.

Key words: biomarker, heat shock protein, environmental assessment, *Crassostrea virginica*.

INTRODUCCIÓN.

Los océanos son ecosistemas de gran importancia para la vida humana, controlan la temperatura de la Tierra mediante su superficie y sus corrientes debido al intercambio de gases y calor con la atmósfera; generan la mayor cantidad de oxígeno por medio de la fotosíntesis de algas, microalgas, pastos marinos y demás organismos que forman parte del ecosistema; proveen de alimento a miles de organismos a través de la cadena trófica desde los productores primarios hasta los consumidores terciarios. Sin embargo, su equilibrio puede alterarse con facilidad por cambios en las condiciones ambientales naturales o por contaminación antropogénica, lo que repercute a nivel social, económico y ambiental.

Como consecuencia del desarrollo industrial, cada año se generan y vierten a los ecosistemas acuáticos miles de compuestos como sustancias químicas, metales pesados, plaguicidas, y detergentes que son potencialmente tóxicos para organismos silvestres (Bierkens, 2000; Choi *et al.*, 2008). El análisis completo de los efectos de los contaminantes en sistemas acuáticos es extremadamente costoso y requiere de personal muy calificado. Por un lado los efectos que produce la mezcla de contaminantes en los seres vivos (antagonistas, sinérgicos o aditivos) y, por la otra, se encuentra la evaluación de los impactos como la acidificación del océano, el calentamiento y la hipercapnia (Bierkens, 2000; Byrne, 2012); y, finalmente, la estimación de cómo afecta la interacción de estos factores, en los organismos a niveles individual, poblacional y en el nivel del ecosistema.

La contaminación de los sistemas acuáticos se ha incrementado, en los últimos 50 años debido al aumento de las actividades humanas como la agricultura; el escurrimiento desde el continente de lixiviados de fertilizantes, plaguicidas y vertederos de basura; contaminación del sedimento por degradación de plásticos y otras sustancias que originalmente no son peligrosas, pero pueden formar productos tóxicos durante su descomposición. Aunado a estos problemas, se asocia la falta o exceso de nutrientes y reducción del hábitat, de tal manera que las consecuencias de estos estresores se observan hasta que se ha causado el daño, entre otros, las lagunas costeras son ecosistemas que han sido altamente impactados por estas actividades pues se encuentran íntimamente relacionadas con aportes continentales además de ser utilizadas como sitios de pesca comercial y actividades recreativas (Jenny *et al.*, 2002; Moissenko, 2005; Collin *et al.*, 2010).

LAGUNAS COSTERAS.

México es un país que posee una extensión litoral de 11,600 km (CONABIO, 2006) con formaciones geológicas importantes entre las que destacan las Lagunas Costeras, que son superficies acuáticas litorales, en donde se lleva a cabo una mezcla de aguas provenientes del continente y del océano y, como resultado del encuentro de dos masas de agua con características diferentes, se presentan fenómenos particulares en su comportamiento físico, químico y biológico; se consideran los sistemas naturales con mayor productividad primaria del mundo y, además, sirven como lugares de reproducción y refugio para especies de importancia alimenticia y

económica (Contreras-Espinosa, 1993; Macauley *et al.*, 1997; Geffard *et al.*, 2007).

Zona de estudio

El sistema estuarino-lagunar Tuxpan-Tampamachoco (Figura 1) se encuentra al norte del Estado de Veracruz, a los 20°58'15" a 21°05' de latitud norte y los meridianos 97°20'30" a 97°24' de longitud oeste, cuenta con una superficie de aproximadamente 1,800 Ha. Tampamachoco es considerada una laguna de características marinas con influencia de agua dulce, se comunica con el mar casi directamente, desembocando sobre el estuario Tuxpan cuyo encuentro con el océano está próximo a los 2 km; sobresale por su elevada riqueza faunística con 99 especies residentes (Contreras-Espinosa, 1993; RAMSAR, 2005; Toledo, 2005). Las lagunas de Pueblo Viejo, Tamiahua y Tampamachoco representan el 89% de la extracción pesquera de ostión en el Estado de Veracruz con alrededor de 25,000 toneladas de producción entre 1991 y 2002 (SAGARPA, 2006); sin embargo, en la Laguna Tampamachoco se ha registrado una disminución importante en esta actividad.

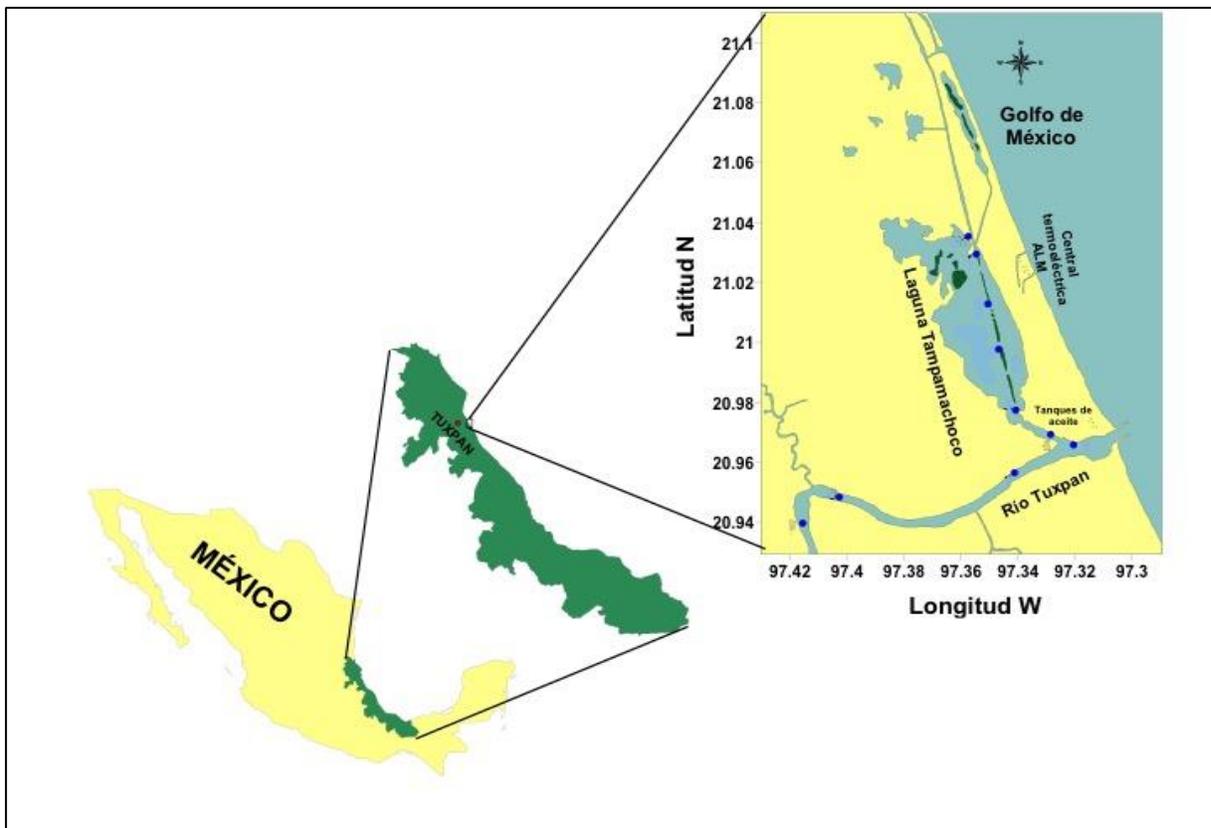


Figura 1. Laguna Tampamachoco. Estaciones geográficas en las que se tomaron muestras de agua para determinar parámetro físico-químicos.

Debido a su importancia económica, ecológica y social es necesario monitorear la salud de las lagunas costeras a través de la evaluación de sus organismos residentes para lo que se eligen organismos bioindicadores como el ostión, que se utilizan para tomarlos como referencia en el resto de la biota.

ORGANISMOS BIOINDICADORES.

Los bioindicadores son organismos en los que se estudian los efectos adversos producidos por químicos a nivel de organismo, población y ecosistema considerando las siguientes características: 1) Amplia distribución; 2) Estilo de

vida generalmente sésil; 3) Extraídos de grandes poblaciones o cultivados. Los bioindicadores pueden proporcionar información acerca del riesgo, así como de los efectos y mecanismos de acción de los contaminantes (Jenny *et al.*, 2002; Gerhardt *et al.*, 2004; Zurita *et al.*, 2005).

Los sistemas acuáticos costeros están influidos por los ecosistemas oceánicos y los terrestres, para su evaluación se analizan organismos bioindicadores como los ostiones y los mejillones debido a que su estilo de vida es sésil y su alimentación por filtración permite la acumulación de xenobióticos y, con esta información se puede estimar la contaminación a través de las respuestas biológicas que produce en los organismos (Andrew *et al.*, 2010).

OSTIÓN AMERICANO (*CRASSOSTREA VIRGINICA*).

El ostión *Crassostrea virginica* fue identificado por Gemlin en 1791, pertenece al Phylum Mollusca; Clase Bivalvia; Subclase Pterimorphia; Orden Ostroidea; Familia Ostreidae; Genero *Crassostrea*; Especie *Crassostrea virginica*; se distribuye en estuarios y lagunas costeras desde el Golfo de San Lawrence en Canadá hasta Yucatán en el Golfo de México (Matthiessen, 2001; Quilang *et al.*, 2007).

C. virginica es un organismo eurihalino y euri térmico con un rango de adaptación de salinidad entre 5 y 30 UPS y de temperatura de 1 a 36°C, sus hábitos filtradores hacen que las corrientes de agua sean los medios para obtener su alimentación, su hábitat ideal requiere de flujos continuos, pero no turbulentos;

estos flujos provocan que los ostiones filtren y retengan contaminantes que permanecen en la columna de agua o de los sedimentos. Es por estas características que están íntimamente vinculados con la salud de las Lagunas y se consideran como organismos bioindicadores para utilizarlos en la vigilancia de estos hábitats críticos del Golfo de México (Toledo, 2005).

El ostión *C. virginica* se desarrolla en estuarios, pero también vive en ambientes marinos costeros. Descarga sus gametos en la columna de agua en respuesta a una variedad de estímulos, incluyendo temperaturas más cálidas, feromonas y la presencia de fitoplancton apropiado, los huevos fertilizados, de aproximadamente 50µm, se desarrollan en larvas trocóforas nadadoras capaces de desplazarse rápidamente por medio de órganos filiformes o cilios y se alimentan del vitelo; durante las siguientes 24 horas se forman sus dos valvas y se alimenta de microalgas y se convierte en una larva véliger con concha, que usa un órgano ciliado (velum) para capturar alimento y para nadar, después de dos o tres semanas, dependiendo de las condiciones de alimento y temperatura, la larva véliger desarrolla una mancha ocular y un pie larval (ahora es llamada larva con ojo o pedivéliger) con el cual explora sustratos potenciales para su asentamiento, desciende al fondo para rastrear un sustrato favorable, como conchas de otros ostiones, botellas de vidrio, botes, pastos marinos, rocas, etcétera; en ese estado ya mide cerca de 300µm y tiene un órgano muscular llamado pie que le permite moverse en el fondo, una vez estimulada a asentarse, cementa su valva izquierda al sustrato y se transforma, por metamorfosis, en un juvenil de ostra descartando

su velum, reabsorbiendo su pie y agrandando sus branquias, en ese momento ya no es capaz de moverse por lo que permanece unido a ese sustrato por el resto de su vida (Matthiessen, 2001; Kennedy, 2009).

Fuera de las valvas, el ostión parece una masa amorfa; sin embargo, al observar detenidamente su anatomía (Figura 2) podemos observar que cuenta con órganos y sistemas que son útiles y muy necesarios para su sobrevivencia, particularmente el elaborado sistema de las branquias que filtra el plancton, circulando el agua que lo rodea (Matthiessen, 2001; Toledo, 2005).

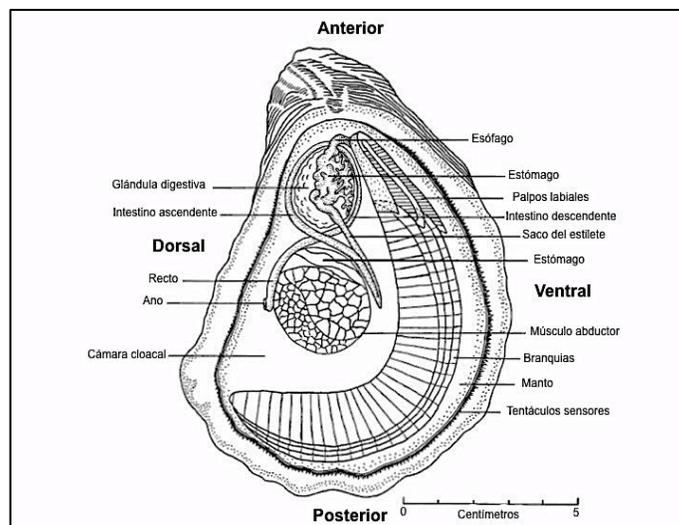


Figura 2. Anatomía del ostión: se distinguen el esófago, la glándula digestiva, el estómago, los intestinos ascendente y descendente, el saco del estilete, el estómago, el recto, el ano, la cámara cloacal, el manto con cilios sensores y las branquias (Imagen modificada de (Ruppert y Barnes, 1996).

Anatomía de las branquias.

El tejido branquial del ostión es un órgano importante para el organismo pues sirve simultáneamente, como una estructura de alimentación que atrapa y selecciona el

plancton vía un mucus producido por las células branquiales y movido hacia la boca del animal; y como un órgano de captación de oxígeno (Tomanek, 2012) tanto la alimentación como la captación de oxígeno son facilitadas por la amplia superficie de las branquias que están constituidas por una demibranchia interior y una exterior que, vistas transversalmente forman una “W”; cada una tiene un plegamiento ascendente y un descendente llamados lamelas compuestas de numerosos filamentos ciliados que se organizan en una fila; este complejo maximiza la eficiencia funcional de las branquias y divide la cavidad pial en dos la cavidad inhalante y la exhalante que se comunican a través de pequeñas aberturas llamadas ostia que abren la cámara de agua pial y están conectadas con tubos de agua (12 filamentos forman una plica o plegamiento de fondo), su rigidez es debido a dos varillas esqueléticas de colágeno que corren a lo largo de los ejes de cada filamento, cada filamento está unido por colágena en enlaces cruzados entre las varillas. En la sección media de las branquias, cercanas al corazón y al músculo abductor, las dos cámaras epibranchiales de cada branchia se fusionan para formar una única branchia. El agua fluye entre la cámara pial y la cámara epibranchial que ocupan la mayor parte de la porción ventral y ventro-posterior de la cavidad del manto.

Es así como la anatomía, desarrollo y hábitos del ostión *C. virginica* determinan que sea considerado como un organismo bioindicador, pues además de tolerar un amplio intervalo de estrés natural y antropogénico (anoxia, estrés osmótico, variación térmica), responden al estrés en cada una de sus células lo que conlleva

a alteraciones fisiológicas. Estas respuestas son particularmente importantes en la respuesta adaptativa de los invertebrados sésiles intersticiales como los mejillones y los ostiones (Hamdoun *et al.*, 2003) y una forma de medirlas es a través de biomarcadores.

BIOMARCADORES.

Los biomarcadores son mediciones que se efectúan en cualquier nivel de la escala biológica de poblaciones silvestres o experimentalmente expuestas a estresores físicos, químicos o biológicos, que proveen índices de exposición o efectos subletales. Cuando una molécula se expresa como parte del mecanismo de defensa, reparación o detoxificación de la célula; se conoce como **biomarcador de exposición**; cuando se trata de una respuesta fisiológica al daño debida al contacto con un estresor potencialmente tóxico del cual la célula u organismo se puede recuperar se denomina **biomarcador de efecto** (Ryan y Hightower, 1996; Bierkens, 2000; Ortiz-Zarragoitia y Cajaraville, 2006; Sarkar *et al.*, 2006).

Las primeras interacciones entre los contaminantes y la biota suceden en la superficie de la célula y sus efectos son apreciables a nivel subcelular y, posteriormente, en los siguientes niveles de la escala biológica; los biomarcadores subcelulares y moleculares son una buena herramienta para detectar los efectos de la presencia de contaminantes en el ambiente pues evitan el reto de interpretar el riesgo mediante el análisis y síntesis de datos toxicológicos a gran escala

(Bierkens, 2000; Fent, 2004; Sarkar *et al.*, 2006; Farcy *et al.*, 2007; Farcy *et al.*, 2008; Farcy *et al.*, 2009).

Aunque en toxicología clínica los biomarcadores se consideran parámetros indicadores de salud general, en toxicología ambiental su uso se define de acuerdo con el tipo de organismo, xenobiótico y ecosistema que se esté evaluando y la mayoría de autores coinciden en que son respuestas biológicas de organismos expuestos a estrés, considerando que la respuesta de un individuo por exposición a contaminación ambiental depende de sus características genéticas y fisiológicas, así como de la ruta de exposición y la dosis (Eason y O'Halloran, 2002; Kite-Powell *et al.*, 2008).

Al ser una herramienta sensible de alerta temprana, los biomarcadores permiten calcular el impacto de los contaminantes en la calidad ambiental y sus efectos deletéreos en el ecosistema, en evaluaciones de riesgo ambiental se han empleado biomarcadores a nivel de transcripción de genes y de proteínas (Bierkens, 2000; Sarkar *et al.*, 2006; Farcy *et al.*, 2007). Los estresores pueden alterar directamente la expresión genética así como la conformación y estabilidad de las proteínas porque son suficientemente lábiles para interactuar con sus sustratos además de ser susceptibles a desnaturalizarse o sobre-expresarse por causa de cambios en el ambiente (Hamdoun *et al.*, 2003), por lo que son considerados como la respuesta efectora a señales del ambientales, como ejemplo se conocen las proteínas de estrés o HSP (por sus siglas en inglés).

PROTEÍNAS DE ESTRÉS HSP.

Las proteínas de estrés o HSP fueron descritas por Ritossa (1996) en *Drosophila bucscikii*; sin embargo, están ampliamente distribuidas, ubicuas y muy conservadas a través de la evolución, en arqueo-bacterias, eu-bacterias, plantas y animales (Singer *et al.*, 2005), la respuesta celular a condiciones desfavorables provoca el incremento transitorio de su expresión (Piano *et al.*, 2004), y su síntesis es el evento más notable antes de los cambios en la actividad y fisiología celular (Piano *et al.*, 2004; Arya *et al.*, 2007).

Para mantener la homeostasis y como respuesta al estrés, la maquinaria celular induce la síntesis de HSP para proteger a otras proteínas contra procesos de desnaturalización, oxidación, cambios de pH, interacción con xenobióticos, cambios bruscos de temperatura, estrés osmótico, etcétera, lo que ayuda a mantener la homeostasis celular bajo condiciones adversas (Chapple *et al.*, 1997; Boutet *et al.*, 2003a; Arya *et al.*, 2007; Ivanina *et al.*, 2008a). En evaluaciones de toxicidad ambiental se han propuesto como biomarcadores sensibles de efecto no específico y en las investigaciones más recientes son utilizadas como herramientas en un primer nivel de diagnóstico para revelar respuestas biológicas inducidas por efectos de contaminación ambiental (Ait-Aissa *et al.*, 2000; Bierkens, 2000; Franzellitti y Fabbri, 2005).

Bajo condiciones de estrés las proteínas muestran sus dominios hidrofóbicos, causando interacciones proteicas no específicas, las HSP impiden su

desplegamiento mediante funciones de estabilización proteica evitando la desnaturalización; por otra parte, en condiciones sin estrés, las chaperonas moleculares son requeridas para estabilizar los dominios hidrofóbicos de las proteínas que están expuestos al ambiente acuoso de la célula durante la síntesis y translocación entre compartimentos celulares (Hamdoun *et al.*, 2003).

Clasificación de las HSP.

Las HSP se han clasificado con base en su masa molecular, secuencias de aminoácidos y funciones, en las familias HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40, HSP24, HSP16 y HSP10kDa, en general sus funciones son como chaperonas y replegamiento de proteínas; sin embargo algunas son específicas dependiendo de su ubicación u organismo en el que se expresen (Bierkens, 2000; Franzellitti y Fabbri, 2005; Arya *et al.*, 2007) como se muestra en la (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de las proteínas de la familia de las HSP.

HSP	Funciones / Sobre-expresión	Autor
HSP100	<ul style="list-style-type: none"> - Agregación y desagregación de proteínas durante estrés - Chaperona - Propagación de semillas * 	(Zolkiewski <i>et al.</i> , 2012)
* Se han encontrado en bacterias, levaduras y plantas, pero no en animales y humanos hasta el momento.		
HSP90	<ul style="list-style-type: none"> - Ciclo celular, - Sobrevivencia celular - Hormonal - Vías de señalización - Metales - Químicos - Temperatura, - Salinidad 	(Choi <i>et al.</i> , 2008)
HSP70	<ul style="list-style-type: none"> - Chaperonas - Plegamiento de proteínas - Estrés térmico - Estrés ambiental - Metales pesados 	(Singer <i>et al.</i> , 2005)
HSP60	<ul style="list-style-type: none"> - Activación de la respuesta del sistema inmune innato por 	(Shi <i>et al.</i> , 2016)

	<ul style="list-style-type: none"> esclerosis e inflamación – Apoptosis – Ciclo celular – Diferenciación celular de los espermatozoides – Desarrollo reproductivo – Respuesta al estrés ambiental – Prevención de desnaturalización de las proteínas bajo estrés térmico 	
HSP27	<ul style="list-style-type: none"> – Modulación de la agregación proteica – Manutención de la integridad del citoesqueleto – Regulación de la apoptosis – Estrés oxidante – Envejecimiento – Cáncer 	(T. Reid <i>et al.</i> , 2019)
HSP10	<ul style="list-style-type: none"> – Protección celular por infección e inflamación – Chaperona en la mitocondria – Inmunomodulación – Proliferación celular – Diferenciación celular – Cáncer – Enfermedades autoinmunes 	(Jia <i>et al.</i> , 2011)

En eucariontes, cada familia de HSP comprende varias isoformas que se sintetizan y regulan de manera independiente, las que se encuentran de forma constitutiva en la célula pertenecen a las chaperonas que son importantes durante el plegamiento correcto de proteínas nacientes y desnaturalizadas; en la translocación de proteínas entre diferentes compartimentos celulares; y en la estabilización de la célula; las HSP que son inducidas se expresan sólo después del estrés, para reparar y proteger proteínas celulares y minimizar su agregación (Bierkens, 2000; Franzellitti y Fabbri, 2005; Singer *et al.*, 2005; Arya *et al.*, 2007).

Regulación de los genes de las HSP70 (Heat shock protein).

Las proteínas chaperonas HSP70 acompañan el replegamiento de péptidos desnaturalizados por estrés para minimizar la degradación proteolítica como parte de un fenómeno conservado denominado “respuesta al choque térmico”. El estrés fisiológico, puede incluir temperatura elevada, daño mecánico, hipoxia, pH

reducido y generación de especies reactivas de oxígeno, lo que lleva a la expresión del gen *hsp70* (Silver y Noble, 2012).

Existen dos genes que codifican para mRNAs de la subfamilia de las HSP70, que corresponden a las formas constitutivas o cognadas (HSC) de alrededor de 72kDa y las inducidas (HSP) de 68-70kDa. La regulación de la expresión de los genes de HSP en eucariontes es dependiente del factor de transcripción de estrés térmico (HSF por sus siglas en inglés). HSF, inmediatamente después de su síntesis en los ribosomas es secuestrado por la HSP70 y otras chaperonas, y es presentado al proteasoma para su degradación. Después del estímulo estresor, el HSF se libera de las HSP en el citoplasma y forma un homotrímero el cual migra al núcleo y se une a los elementos de estrés térmico (HSE por sus siglas en inglés) en la región promotora de los genes *hsp*, provocando la activación de la transcripción de esos genes (Ait-Aissa *et al.*, 2000; Boutet *et al.*, 2003a; Hamdoun *et al.*, 2003; Franzellitti y Fabbri, 2005).

Las proteínas mal plegadas constituyen una de las señales que inducen la transcripción de las HSP70; se ha demostrado su síntesis en *C. gigas*, *M. edulis* y *M. Galloprovincialis* (Ait-Aissa *et al.*, 2000; Boutet *et al.*, 2003a), Farcy (2009) señala que un incremento significativo sus niveles indica que las células están reaccionando a los estímulos (internos o externos) por lo que pueden considerarse como indicadores tempranos de condiciones de estrés.

Debido a su importancia en el mantenimiento de la homeostasis proteica y sensibilidad al estrés ambiental se decidió evaluar las proteínas de estrés HSP70; su expresión a nivel genético y el perfil proteico total de branquia de ostiones en diferentes condiciones ambientales.

JUSTIFICACIÓN.

Los océanos representan una fuente de alimentos ricos en proteínas de alta calidad, sus costas son sitios de descanso y esparcimiento para el ser humano, son generadores potenciales de recursos energéticos renovables, así como proveedores de oxígeno para la vida; sin embargo, el ser humano ha degradado el hábitat por explotación o contaminación incontroladas.

México se encuentra entre los países con mayor cantidad de línea de costa del mundo conformada por ecosistemas como las lagunas costeras, estuarios y del que son espacios estratégicos para el desarrollo económico, social y ecológico de un país, es por esta razón que su preservación es la clave para mejorar la competitividad y el crecimiento. Una forma de prevención es evaluar a los organismos residentes en las lagunas costeras, pues al extrapolar los resultados al resto de la biota en el ecosistema (incluyendo al ser humano) se pueden adoptar medidas de mejoramiento y se obtendrá un ambiente costero sano necesario para alcanzar el potencial de su zona económica exclusiva.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Existirá diferencia en la expresión de los genes y las proteínas de estrés HSP70 así como en la expresión del perfil proteico de los ostiones extraídos durante condiciones naturales y de laboratorio?

HIPÓTESIS.

Si la Laguna Tampamachoco no está sujeta a contaminación, los ostiones residentes y bajo condiciones óptimas controladas y sometidos a estrés térmico (laboratorio), presentarán respuestas fisiológicas diferentes debidas a las condiciones ambientales. Los resultados de la evaluación de la expresión de los genes y las proteínas HSP y los perfiles proteicos en ostiones silvestres y de laboratorio proporcionarán un indicio de su estado de salud que podrá ser extrapolado y comparado con el resto de la biota residente en el ecosistema.

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar las diferencias en las expresiones genética y proteica como respuestas a estrés en los ostiones de la Laguna Tampamachoco en dos estaciones climáticas características de la zona.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Analizar el patrón proteínico mediante electroforesis de branquias de ostiones de la Laguna Tampamachoco.
- Comparar el patrón proteínico mediante electroforesis de branquias, manto y glándula digestiva de ostiones de la Laguna Tampamachoco.
- Comparar el patrón proteínico mediante electroforesis bidimensional de branquias de ostiones de la Laguna Tampamachoco con otras Lagunas.
- Evaluar el estado de inducción de estrés mediante la identificación de las isoformas de proteínas HSP70 por medio de inmunodetección en branquia de ostiones de la Laguna Tampamachoco.

MATERIALES Y MÉTODOS.

La metodología consistió en dos partes: el Trabajo en Campo y el Trabajo en Laboratorio.

TRABAJO EN CAMPO.

Se llevaron a cabo tres recolectas, en época de secas (abril de 2013); en época de nortes (enero de 2014) y (febrero de 2016).

En diez estaciones geográficas dentro del Sistema Estuarino-Lagunar Tuxpam-Tampamachoco se midieron los parámetros físico-químicos: Temperatura (°C); Oxígeno Disuelto (OD mg/L); pH y salinidad (UPS).

En un banco ostrícola dentro de la Laguna (Estación geográfica 2) se recolectaron 50 muestras de ostión durante cada recolecta.

Caracterización y disección de muestras.

A los ostiones recolectados en 2013 y 2014 se les disecaron las branquias después de medirlos y pesarlos. A los ostiones recolectados en 2016 además se les disecó el manto y la glándula digestiva.

Para los ensayos individuales se utilizaron 10 individuos; para los ensayos en grupos se utilizaron 5 individuos recolectados en 2013 y 2014. Los ostiones recolectados en 2016 se utilizaron en grupos de 5 individuos para los ensayos.

Conservación de las muestras.

Las muestras de los tejidos disecados se conservaron tanto para expresión genética como para proteínas.

Para expresión genética se pesaron los tejidos y se les colocó un volumen de 1µL/µ1g de RNA Later (Ambion 7020) que permea el tejido para estabilizarlo y protegerlo *in situ* sin necesidad de congelarlo inmediatamente ni perder la calidad y cantidad de RNA.

Para proteínas se pesaron los tejidos y se les colocó un volumen de 1µL/µ1g de Amortiguador de Lisis RIPA (50mM Tris HCl pH 8.0; 150mM NaCl; 0.01 Igepal CA-630; 0.5% Desoxicolato de Sodio; 0.1% Dodecil Sulfato de Sodio), adicionado un cóctel inhibidor de proteasas (Sigma P8340) a una concentración de 1:1000 (Peach *et al.*, 2015).

Todas las muestras se mantuvieron a 4°C hasta llegar al laboratorio donde se congelaron a -70°C.

Control positivo (CP).

Diez ostiones de cada estación se colocaron en un acuario de 96L con agua marina artificial elaborada con Instant Ocean[®], (Kent Marine, Acworth, GA, USA) bajo las siguientes condiciones: pH 7.9; NH₃-NH₄>0.02 mg/l; PO₄ 0.25 mg/l; NO₃>5 mg/l; NO₂>0.1 mg/l; temperatura 23±2°C; salinidad 20 UPS. Se alimentaron con Marine Snow (Two Little Fishes Inc.) a aproximadamente 1x10¹⁰ células por

litro cada tres días. Veintiún días después se expusieron a estrés térmico a 40°C por dos horas y se llevaron a cabo los mismos pasos de caracterización y conservación que con los ostiones recién extraídos; de igual manera los análisis se realizaron en individuos y grupos de 5 individuos.

EXPRESIÓN GENÉTICA.

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa-Transcripción Reversa (RT-PCR por sus siglas en inglés) permite la identificación de genes que se expresan diferencialmente en respuesta a un estímulo. El análisis de expresión de genes se llevó a cabo por medio de esta técnica. En primera instancia obtiene un molde de RNA que es primero convertido en uno de DNA complementario (cDNA) usando la enzima transcriptasa reversa. El cDNA entonces es utilizado como un molde para la amplificación exponencial utilizando PCR.

Diseño de cebadores.

Las secuencias de los cebadores forward y reverse de β -Actina y Hsp70 fueron diseñados con el programa Primer-BLAST de NBCI, todas las secuencias fueron específicas de *Crassostrea virginica*, de acuerdo con la biblioteca del GeneBank y los números de accesos presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencia de cebadores y características de productos utilizados para extracción de fragmentos de genes utilizados para PCR.

Gen (mRNA)	Número de Acceso GeneBank	Cebador	Tm (°C)	GC %	Producto de amplificación
Hsp70	AJ271444.1	5'GTGCAGGAATTCAAGCGCAA3' F	56.8	50	218
Hsp70	AJ271444.1	5'AAAGTGGCGCGGAACAAATC3'R	56.7	50	
Actina	X75894.1	5'ATGGTGTGTCCCACACAGTC3'F	57.3	55	352
Actina	X75894.1	5'ATACCGGCGGATTCCATACC3'R	56.8	55	

Extracción de mRNA:

La extracción de mRNA con se realizó el. Todos los pasos a continuación se realizar kit de extracción EZ-10 spin column animal total RNA mini-preps kit BioBasic Inc. (BS82312)on a temperatura ambiente y la centrifugación se realizó por 30 segundos a 15,996 g.

1. En un tubo de centrifuga de 1.5mL libre de RNAsas se agregaron: 350µL de amortiguador de lisis A-G¹ y 25-50mg de tejido.
2. Se procedió a macerar con un pistilo de teflón por 2 minutos y se incubó 5 minutos para asegurar la lisis.
3. Se agregaron 175µL de etanol, se mezcló por inversión transfiriéndose a una columna para centrifugarse y se descartó el sobrenadante.

¹ El fabricante no especifica que contiene este amortiguador.

4. Se agregaron 500µL de solución universal GT² (Tiocianato de Guanidina), se centrifugó y se descartó el sobrenadante.
5. Se agregaron 500µL de solución universal NT³ se centrifugó y se descartó el sobrenadante.
6. Se centrifugó una vez más para remover un último residuo de etanol.
7. Se colocó la columna en un nuevo tubo de 1.5ml libre de RNasas y se le agregaron 50µL de agua libre de RNasas, se mantuvo a temperatura ambiente por 2 minutos y se centrifugó.
8. La solución de ARN se guardó a -80°C hasta el análisis.

El RNA extraído se cuantificó en un espectrofotómetro Nano Drop 2000 UV-Vis Spectrophotometer Thermo Scientific, y su pureza se determinó mediante la relación A_{260}/A_{280} . El RNA puro puede exhibir una razón de A_{260}/A_{280} de 2.0, sin embargo, debido a las variaciones entre los individuos, los materiales y la persona que lleve a cabo el procedimiento la razón para RNA se encontrará en un intervalo de 1.7 a 2.1.

² Tiocianato de Guanidino

³ El fabricante no especifica que contiene esta solución.

Retrotranscripción (RT):

La Retrotranscripción se realizó con el kit Maxima H Minus First SDtrand cDNA Synthesis (Thermo Scientific #K1651). En un tubo de centrifuga libre de RNAsas para cada muestra se agregaron: RNA molde (300ng); Oligo (dT)₁₈ cebador (100 μ mol); 10mM dNTP Mix (0.5 mM concentración final); agua libre de RNAsas hasta un volumen final de 15 μ L, se mezclaron suavemente y se incubaron por 5 minutos a 65°C. Inmediatamente se colocaron las muestras en hielo y se agregaron 4 μ L de 5X RT Buffer, 1 μ L de Maxima minus Enzyme Mix, todo en un volumen final de 20 μ L, se mezcló suavemente y se centrifugó por 1 minuto a baja velocidad. La retrotranscripción se realizó incubando por 30 minutos a 50°C y posteriormente a 85°C por 5 minutos en un termociclador Eppendorf Mastercycler.

Reacción en cadena de polimerasa (PCR).

La amplificación se llevó a cabo utilizando GoTaq®DNA polymerase de PROMEGA, de acuerdo con las instrucciones del fabricante: en un tubo de microcentrifuga se colocó amortiguador Go-Taq de reacción a 1X; mezcla de dNTPs a 0.2mM; Primer Forward a 1 μ M; Primer Reverse a 1 μ M; GoTaq Polimerasa 1.25 u; cDNA <0.5 μ g. Las condiciones de amplificación fueron: Primer ciclo 95°C por 2 minutos; 35 ciclos de 95°C un minuto; 57°C un minuto; 72°C por un minuto; un ciclo final de elongación a 72°C por 5 minutos. Los productos de amplificación se sometieron a una electroforesis en un gel de agarosa al 2%,

teñido con bromuro de etidio y se visualizaron en un Transilluminator UV M-20 Entela.

PROTEÍNAS.

Extracción de proteínas.

Las muestras congeladas se maceraron y se centrifugaron a 15,996 g por 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se congeló a -70°C hasta que se utilizó.

Cuantificación de proteínas.

La cuantificación de las proteínas se realizó por medio del método de Bradford (1976).

Electroforesis (PAGE).

El fundamento de la Electroforesis o PAGE (por sus siglas en inglés Polyacrylamide gel electrophoresis) consiste en separar moléculas (proteínas) por su masa molecular y su carga eléctrica de acuerdo con su movilidad en un campo eléctrico a través de una matriz porosa, así después de un cierto tiempo las moléculas cargadas positivamente se desplazarán hacia el cátodo (polo negativo) y aquellas cargadas negativamente se desplazarán hacia el ánodo (polo positivo). Las proteínas de mayor tamaño encontrarán mayor resistencia que las de menor tamaño al avanzar a través de los poros del gel. Por tanto, la fricción que se

observa durante el movimiento electroforético en un gel depende de la masa y la forma de la molécula, en adición a su carga eléctrica.

Para el PAGE se utilizaron 30µg de proteínas solubles totales que se diluyeron en buffer de muestra (Tris-HCl 0.5M pH 6.8; Glicerol 30%; SDS 4%; 5% azul bromofenol) a una proporción 1:2, posteriormente se calentaron a 95°C por 4 minutos e inmediatamente se cargaron en un gel de compactación de acrilamida al 4% seguido por uno de separación al 10% (Laemmli, 1970).

La PAGE se corrió aproximadamente 2 horas a 25mA por gel en una cámara de electroforesis Mini-PROTEAN Tetra Cell electrophoresis chamber (Bio-Rad) con amortiguador de corrida (25mM Tris, 192mM glicina and 0.1% SDS pH 8.3) a temperatura ambiente.

Posteriormente los geles se fijaron con Etanol 40%; Ácido Acético 10% y Agua desionizada 50% (Garfin, 1990). Después se tiñeron con 0.25% de azul Brillante de Coomassie G-250 disuelto en solución fijadora y finalmente se destiñen con la misma solución (Merril, 1990).

Geles de gradiente.

Con una bomba peristáltica (Amersham Biosciences) y dos jeringas de 20mL y 10mL se rellenaron los vidrios de 1.5mm de espesor para generar un gel de gradiente de acrilamida de 6% a 20%. Sobre un agitador magnético, se unieron la boquilla de la jeringa de 20mL con la bomba y se colocaron 4mL de solución de

gel de acrilamida de concentración 20% y se le agregaron 20 μ L de Persulfato de amonio 10% recién preparado y 2 μ L de TEMED, inmediatamente después, se unió el empaque del émbolo con el cilindro de la jeringa de 10mL y se rellenó con 6mL de gel de 6% y se le agregaron 30 μ L de Persulfato de amonio 10% recién preparado y 3 μ L de TEMED, se mantuvo en agitación con un imán magnético durante el tiempo de llenado del gel (aproximadamente 5 minutos). Una vez polimerizado el gel se procedió a procesar las muestras de la misma forma que en la SDS-PAGE.

ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL 2DE

La electroforesis bidimensional es una técnica de alta resolución cuyo fundamento es separar mezclas complejas de proteínas a partir de dos métodos físicos distintos.

Primero las proteínas son separadas por su punto isoeléctrico (pI); introduciendo la mezcla de proteínas en un gel con gradiente de pH contenido en una tira plástica IPG (immobilized pH gradient por sus siglas en inglés) en el que los extremos N y C terminal y sus residuos ionizables captan o liberan protones de acuerdo con el pH, por lo que su carga eléctrica global dependerá del pH del entorno, a este gel se le aplica un campo eléctrico en el que las moléculas de la proteína con carga neta positiva son atraídas hacia el cátodo, y las de carga neta negativa hacia el ánodo. Conforme las moléculas de la proteína se acercan a su pI van perdiendo carga eléctrica, hasta llegar al valor de pH en el que su carga neta

sea cero y dejan de moverse. En ese momento las proteínas se han enfocado pues las moléculas de la proteína que inicialmente se encontraban dispersas por el gradiente de pH se concentran en un solo punto que corresponde a su pI; de aquí el nombre de Isoelectroenfoque IEF isoelectric focusing (por sus siglas en inglés).

En la segunda dimensión las proteínas son separadas por su mM por electroforesis en poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE).

Para este ensayo además de las muestras de la Laguna Tampamachoco se consiguieron muestras de ostión de las lagunas de Mandinga y Alvarado a las que se les realizaron los mismos tratamientos que a las muestras de Tampamachoco. Se tomaron grupos de 5 individuos de ostión de las épocas de Secas 2013 (M5, M6, M7 y M8) y Nortes 2014 (M1, M2, M3 y M4) de Tampamachoco; época de Secas 2014 (M11 y M12) de Alvarado; época de lluvias 2014 (M9 y M10) de Mandinga; controles positivos (M13 y M14) y controles negativos y (M15 y M16) de las que se obtuvieron un total de 18 muestras agrupadas, es decir un total de 90 individuos.

A partir de cada muestra se precipitaron 150 µg de proteínas solubles totales después se rehidrataron con amortiguador de rehidratación (8M-Urea; 2M-Thiourea; 2%-CHAPS; 10mM-DTT; 100µg Amberlite; Trazas de azul-Bromophenol; 1.20%-IPG) toda la noche a 25°C. El Isoelectroenfoque (IEF) se llevó a cabo el con el siguiente programa: 300V-linear-1hr; 300V-Rapid-3hrs;

1000V-linear-6hrs; 8000V-linear-4hrs; 500V-Rapid-6hrs. Inmediatamente después del IEF, se llevó a cabo la PAGE por 2:00 horas a 25mA por gel. Los geles se tiñeron con Coomassie coloidal (0.035g Coomassie azul R-250; 5ml alcohol etílico 95%; 5.64ml ácido tricloracético 100%; agua desionizada hasta un volumen final de 100ml) toda la noche en movimiento lento después se destiñeron con agua desionizada. Finalmente se escanearon y se analizaron las imágenes.

Análisis de imágenes. Con las imágenes de las electroforesis bidimensionales se hizo un análisis utilizando el programa ImageJ (Schneider *et al.*, 2012), primero se transformó la imagen a una escala de grises de 8-bits, posteriormente se calibró dentro de un intervalo de grises y luego se midió cada punto (spot) para obtener la densidad integrada; en este caso se midió de manera arbitraria un grupo de proteínas que apareció en todos los geles y el total del gel para poder normalizar. El programa calcula la densidad integrada que es la suma de los valores de los píxeles de la imagen y es equivalente a la multiplicación del área por el valor de la media de la escala de grises de la imagen, una vez obtenidos estos datos se normalizaron dividiendo la densidad integrada de cada dato por la densidad integrada de la suma de los spots medidos.

ELECTROTRANSFERENCIA (WESTERN BLOT)

Para llevar a cabo la electrotransferencia o western blot (WB) fue necesario hacer en primera instancia una PAGE, después se continuó con los siguientes pasos:

1. Transferencia: Después de realizar la PAGE-SDS se procedió a transferir los geles a una membrana de nitrocelulosa en una cámara de transferencia utilizando Tampón Towbin (Glicina 0.192M, Tris 0.025M y metanol 20%) por 1:30 horas a 120 Volts.
2. Tinción con Rojo Ponceau: las membranas se tiñeron para verificar una correcta transferencia, se destiñeron con agua ultra pura.
3. Boqueo: Las membranas se bloquearon con una solución de fosfato salino con Tween 20 TBS-T₂₀ (PBST: KH₂PO₄:1.4mM; Na₂HPO₄:8mM; NaCl:140mM; KCl:2.7mM; Tween20 0.1%) con leche descremada al 5% durante una hora.
4. Incubación: con el anticuerpo primario Anti-Hsp70 (Sigma H5147) en una solución 1:5000 por toda la noche en refrigeración y movimiento continuo.
5. Lavado: se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con TBS-T₂₀.
6. Incubación: con el anticuerpo secundario Anti-Mouse (Sigma) por una hora en refrigeración y movimiento continuo.
7. Lavado: se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con TBS-T₂₀.
8. Revelado: se procedió a revelar las membranas con Clarity Western ECL-Substrate (17050060 Bio-Rad).

Todos los pasos anteriores se realizaron en agitación orbital continua (Peach *et al.*, 2015) y se fotografiaron con un Fotodocumentador LG-1500.

ANÁLISIS DE IMÁGENES.

La masa molecular de las bandas visibles en la PAGE se determinó por medio de Rf que son valores que se obtienen a partir de la distancia recorrida por la banda con relación a el corrimiento de los marcadores de peso molecular en las imágenes de los geles de acrilamida (Lambin *et al.*, 1976). Cabe señalar que en el caso de los ostiones de 2013 y 2014 se realizaron ensayos comparativos de expresión genética y proteínas (PAGE-SDS, WB y 2DE) y a los de 2016 se les realizaron ensayos comparativos de proteínas entre los tejidos de las branquias, manto y glándula digestiva.

Las imágenes de WB se capturaron con un fotodocumentador LG-1500 y la densidad óptica relativa (O.D.) se cuantificó con el programa ImageJ. Los datos se normalizaron contra la relación obtenida de la determinación de actina y se promediaron los tres ensayos para obtener la O.D. relativa de la expresión de las Hsp-70.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para observar las diferencias entre las medias de la O.D. relativa, de las isoformas de Hsp70 y de los parámetros físico-químicos entre las estaciones climáticas secas y nortes se realizó un análisis de varianza de una vía y una prueba T. Las medidas de pesos y tallas se promediaron y se les aplicó una prueba de Fisher para comparar las poblaciones. Los estadísticos se llevaron a cabo con una significancia estadística de 95% ($p > 0.05$)

RESULTADOS

PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS.

Dentro del sistema estuarino-lagunar Tuxpam-Tampamachoco se midieron parámetros físico-químicos de pH, Temperatura (°C), Salinidad (UPS) y Oxígeno Disuelto (mg/L) en diez estaciones geográficas (Tabla 3) durante las estaciones climáticas de Secas (2013), Nortes (2014) y Nortes (2016).

Tabla 3. Ubicación de estaciones geográficas (latitud y longitud) dentro del Sistema estuarino-lagunar Tuxpam-Tampamachoco.

Estación Geográfica	Latitud	Longitud
1	97°35'47	21°02'94
2	97°35'04	21°01'25
3	97°34'66	20°99'75
4	97°34'08	20°97'72
5	97°32'94	20°96'91
6	97°32'05	20°96'60
7	97°34'11	20°95'44
8	97°40'27	20°94'86
9	97°41'56	20°93'98
10	97°30'59	20°26'90

Los promedios de los parámetros fueron pH 8.5 ± 0.19 ; 8.29 ± 0.12 y 7.81 ± 0.36 ; temperatura 26.04 ± 0.93 ; 19.10 ± 0.32 y 20.00 ± 0.82 (°C); salinidad 31.07 ± 4.59 ; 31.40 ± 3.72 y 31.80 ± 1.14 (UPS); y oxígeno disuelto (O₂D) 10.15 ± 2.56 ; 6.21 ± 0.68 y 5.04 ± 1.33 mg/L, respectivamente (Tabla 4).

Tabla 4. Parámetros físico-químicos medidos en las estaciones de Secas (2013), Nortes (2014) y Nortes (2016).

Estación Geográfica	pH			Temperatura (°C)			Salinidad UPS			Oxígeno Disuelto (mg/L)		
	Sec	Nts	Nts	Sec	Nts	Nts	Sec	Nts	Nts	Sec	Nts	Nts
	2013	2014	2016	2013	2014	2016	2013	2014	2016	2013	2014	2016
1	8.08	8.08	7.23	25	19	19	34	26	31	8.44	6.04	4.75
2	8.25	8.21	7.40	25	19	20	34	34	33	8.25	6.11	5.31
3	8.37	8.21	7.62	25	19	20	34	33	34	8.24	6.34	5.96
4	8.38	8.24	7.63	26	19	20	34	34	34	10.27	6.49	5.96
5	8.40	8.25	7.70	26	19	20	34	35	35	13.57	6.57	6.36
6	8.49	8.28	7.78	28	20	22	36	36	36	14.44	7.26	7.16
7	8.53	8.39	8.11	27	19	20	31	36	30	12.66	7.10	4.19
8	8.61	8.40	8.20	27	19	20	27	31	30	10.19	5.50	4.19
9	8.65	8.43	8.22	27	19	20	24	30	26	8.21	5.35	3.46
10	8.71	8.44	8.23	25	19	19	23	25	25	7.23	5.35	3.06

Al comparar los parámetros físico-químicos de las estaciones de Secas (2013) y Nortes (2014), los resultados muestran que la temperatura y el oxígeno disuelto (O₂D) son diferentes, mientras que la salinidad y el pH son estadísticamente similares en ambas estaciones ($p=0.05$). Sin embargo, Al comparar las tres épocas notamos diferencias significativas entre el pH, la temperatura y el O₂D, siendo la salinidad el único parámetro que continuó sin cambios. Todo lo anterior con un intervalo de confianza de 95% ($p=0.05$).

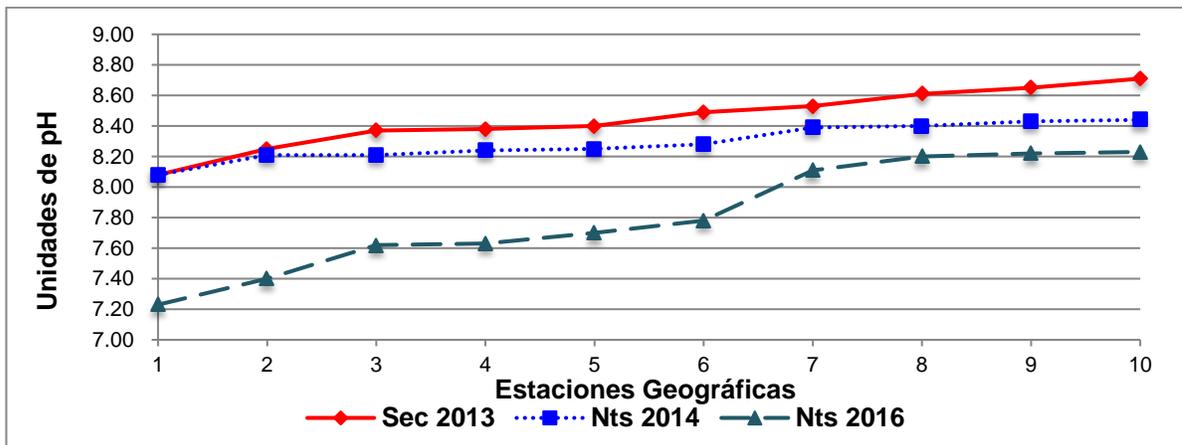


Figura 3. Gráfica de pH para las estaciones Secas (2013), Nortes (2014) y Nortes (2016). Se observa una acidificación durante ambas épocas de nortes con relación al primer muestreo, siendo más ácida la época de Nortes (2016).

El pH reportado en la época de Nortes 2016 presenta una acidificación de aproximadamente 0.7 unidades con respecto a las mediciones realizadas en las épocas de Secas 2013 y Nortes 2014.

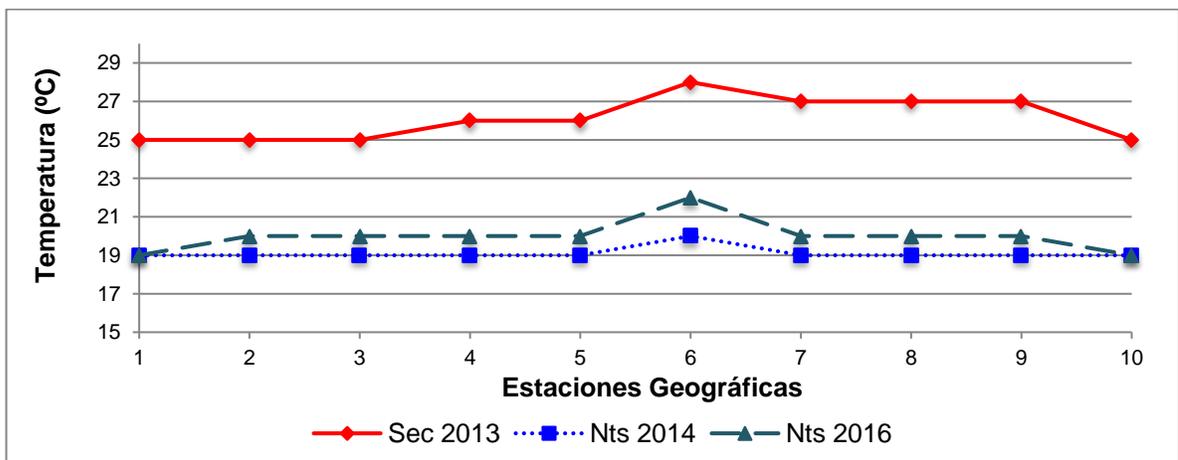


Figura 4. Gráfica de temperatura para las estaciones Secas (2013), Nortes (2014) y Nortes (2016). La época de Secas muestra una temperatura mayor con 7°C de diferencia con las épocas de Nortes en que ambas se mantuvieron entre 19 y 20°C.

En la época de Secas 2013, la temperatura alcanzó un promedio de 7°C más que en las épocas de Nortes.

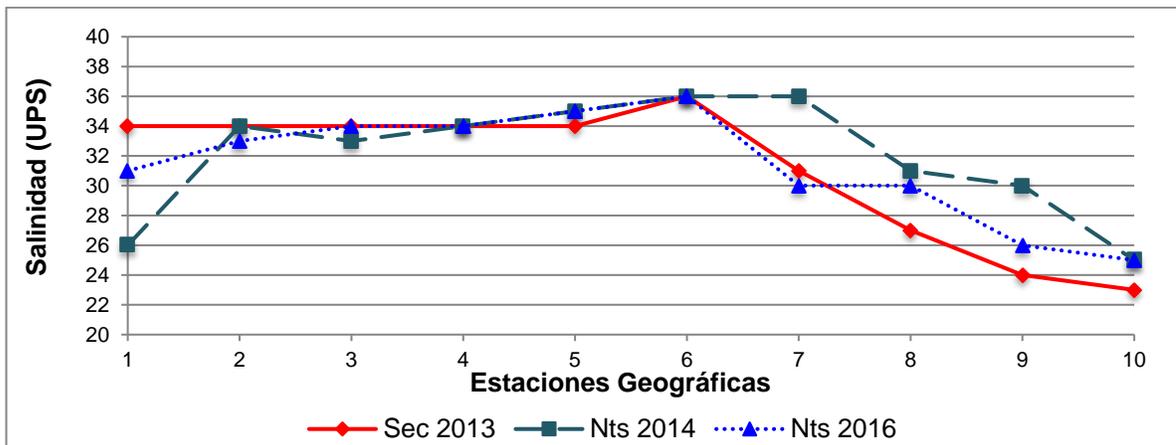


Figura 5. Gráfica de salinidad (UPS) para las estaciones Secas (2013), Nortes (2014) y Nortes (2016). La salinidad se mantuvo constante en todas las épocas de recolecta, con algunas diferencias entre estaciones geográficas.

La salinidad se encontró en promedio alrededor de las 31UPS en todas las recolectas, los cambios observados corresponden con la ubicación geográfica de la recolecta.

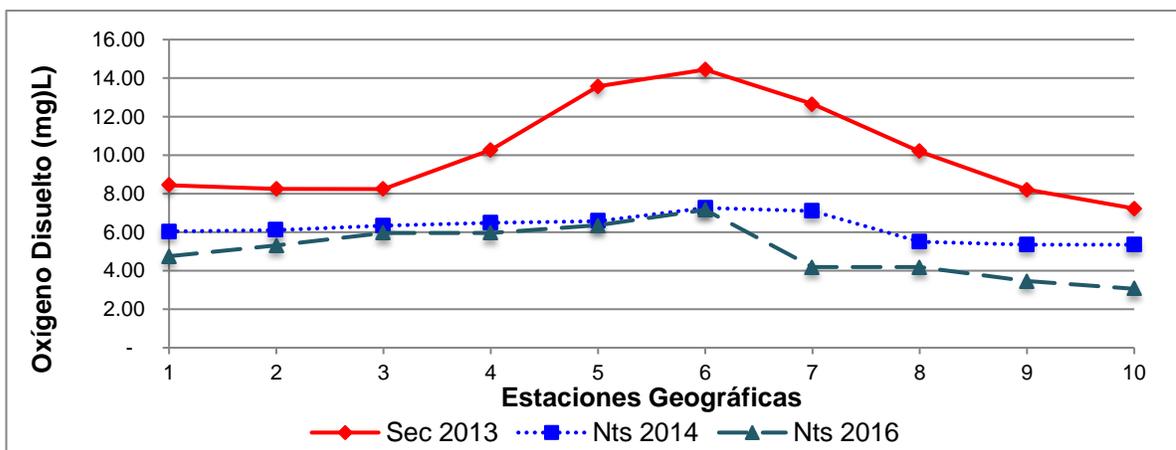


Figura 6. Gráfica de Oxígeno Disuelto (mg/L) para las estaciones Secas (2013), Nortes (2014) y Nortes (2016). Se observa mayor concentración de oxígeno disuelto en época de secas.

El oxígeno disuelto para la estación de Secas fue mas elevado que en ambos muestreos de las estaciones de Nortes.

Discusión Parámetros Físico-Químicos.

Los procesos de reproducción, desarrollo y crecimiento de los ostiones están ligados a los parámetros físicos, químicos y biológicos que se derivan de los fenómenos meteorológicos, así como a la disponibilidad de recursos energéticos durante las estaciones climáticas. Aunque las interacciones bióticas son importantes en la determinación de abundancia poblacional o individual de los organismos marinos, los factores abióticos o físicos son la principal razón de la estabilidad de estas abundancias, el cambio climático acompaña una serie de factores físicos como temperatura, pH, salinidad e hipoxia que afectan especialmente a organismos marinos (Tomanek, 2012).

pH.

Debido a las actividades humanas como combustión de fósiles y deforestación la concentración global de CO₂ atmosférico se ha incrementado de 280 ppm a 384 ppm en 2007 a una tasa de crecimiento anual de 0.5% (100 veces más rápido que en los últimos 650,000 años), el 25% de CO₂ liberado es captado por el océano obteniendo como resultado cambios en el sistema químico del carbono marino; el incremento de CO₂ induce una disminución del pH, lo que induce la disminución en la concentración del ion Carbonato (CO₃⁻²) y el aumento del ion Bi-Carbonato (HCO₃⁻), en consecuencia los procesos biogeoquímicos y ecológicos son perturbados y deterioran la biodiversidad en múltiples niveles biológicos, en

consecuencia los organismos calcificados (moluscos, crustáceos y algas) son afectados de manera negativa (Wei *et al.*, 2015).

El incremento en la captación de CO₂ por el océano resulta en una disminución de pH en alrededor de 0.1 unidades; mientras el océano abierto se caracteriza por su constante pH, los estuarios y lagunas costeras exhiben una mayor fluctuación (Tomanek, 2014), en el sistema estuarino-lagunar Tuxpam-Tampamachoco las mediciones de pH entre 2013 y 2016 presentan una acidificación de aproximadamente 0.7 unidades de pH de manera similar Melwani (2016); reportó que el pH en sitios cercanos al puerto de Sydney fue significativamente más ácido de lo que se esperaba.

La respuesta de los organismos marinos a la acidificación oceánica depende de factores como filogenética, estadio de vida o alimentación; los organismos calcificados son los mas sensibles a la acidificación debido a la disminución de CaCO₃ y la disolución de calcita; sin embargo, los efectos no se limitan a la calcificación de sus estructuras, sino que también incluyen transporte de iones y metabolismo energético en toda la biota marina (Tomanek, 2014).

Oxígeno Disuelto.

El Programa Ambiental de las Naciones Unidas (UNEP, 2008), señala que la concentración de oxígeno disuelto idónea para sistemas acuáticos no debe ser menor de 6mg/L cuando la temperatura del agua sea mayor a 20 °C y de 9.5 mg/L cuando la temperatura del agua sea igual o menor a 20 °C. Patterson (2014)

señala que la hipoxia o baja concentración de oxígeno (< 2 mg/L) genera impactos significativos al ecosistema en términos de diversidad y abundancia de especies, un nivel bajo de concentración de OD de 4 mg/L sería el nivel mínimo para mantener un sistema saludable.

Durante la temporada de Secas hay poco ingreso de agua al sistema vía escorrentías o lluvias por lo que la remoción de las capas superficiales permanece estática y por tanto el O₂D tiende a ser bajo; sin embargo, se observó una concentración de 10.15 mg/L (148.60 %); que pudo haberse producido por un exceso de fotosíntesis debida al ingreso de los rayos solares en esta temporada.

En época de Nortes la influencia de los vientos del norte provoca el ingreso de agua por lluvias y la escorrentía proveniente de las montañas que desplazan las capas superficiales de la columna de agua provocando a su vez el ingreso de oxígeno, en estas temporadas los niveles alcanzados fueron de 6.21±0.68 y 5.04±1.33 mg/L (80.13 y 66.32 %) a una temperatura de 19.10 y 20.00 °C para 2014 y 2016 respectivamente lo que representa un desequilibrio con relación a lo que propone la UNEP (2008).

Melwani (2016) reportó una saturación entre 53 y 84% de oxígeno durante la época de Secas en cuatro sitios adyacentes al puerto de Sydney, Australia que fueron altamente impactados por actividades meteorológicas y antropogénicas y son similares a lo reportado en la época de Nortes de este estudio. Betanzos-Vega (2016) reportaron una concentración en Octubre y Diciembre de 2014 de 4.18 y

6.91 mg/L (55.22 y 111.09 % de saturación) con temperaturas de 24.46 y 29.72 °C en costas de Cuba siendo muy similares a los valores reportados en época de Nortes de este estudio.

Salinidad.

En el sistema estuarino-lagunar Tuxpam-Tampamachoco el único parámetro que permaneció estable a través de los muestreos fue la salinidad con 31 UPS, Melwani (2016); reportó que la salinidad y la temperatura permanecieron estables en las localidades analizadas pero su muestreo fue en una sola temporada.

An (2010) menciona que la salinidad puede causar respuestas fisiológicas como cambios en hormonas plasmáticas, metabolismo energético, equilibrio electrolítico y generación de especies reactivas al oxígeno causando daño oxidativo; para Shumway (1996) y Barnes (2007), el intervalo de salinidad óptimo para la sobrevivencia de los ostiones fluctúa entre los 14 y 28 UPS; intervalo en el que las poblaciones son densas como resultado de su elevada capacidad de reproducción y metamorfosis larval.

En la época de Secas se considera “normal” un incremento de la salinidad debido a la evaporación que genera una elevación en la concentración de las sales disueltas en la columna de agua, mientras que en la época de Nortes generalmente se espera una disminución en la salinidad debida a la intensa actividad pluvial e ingreso de agua dulce; actividad eólica, remoción del sedimento

e incremento en la disponibilidad de alimento y disminución de la temperatura, en este estudio no hubo diferencias significativas en cuanto a la salinidad reportada.

Temperatura.

Las temperaturas medidas fueron 26.04, 19.10 y 20.00 °C para las épocas de Secas (2013) y Nortes (2014 y 2016) respectivamente, de acuerdo con Shumway (1996) y Abbe (2000) la variación en la temperatura ocasiona cambios metabólicos en los organismos acuáticos, al ser poiquiloterms los ostiones pueden soportar cambios paulatinos de temperatura, las aguas cálidas (>25°C) producen crecimiento temprano e incremento de actividad metabólica con la subsecuente acumulación de xenobióticos, mientras que las temperaturas bajas (<5°C) los ostiones reducen su metabolismo que se puede recuperar al incrementar gradualmente la temperatura. Sin embargo, estos rangos pueden variar de acuerdo con las condiciones geográficas, Team (2007) proponen que el intervalo óptimo de desarrollo de *C. virginica* se encuentra entre 20 y 30 °C, por lo que podemos aseverar que la temperatura registrada no fue un factor de estrés en el presente estudio.

OSTIONES BAJO CONDICIONES CONTROLADAS.

El lote de ostiones que se mantuvo en condiciones controladas presentó una sobrevivencia del 100% a los 21 días lo que permitió obtener dos grupos; uno se sometió a estrés térmico (control positivo) y el otro se analizó igual que los grupos silvestres (control negativo).

Discusión Ostiones bajo Condiciones Controladas.

Las condiciones en las que se mantuvieron los ostiones fueron óptimas para su desarrollo ya que algunos de los ostiones sobrevivieron al 100 % durante mas de 60 días. Generalmente a los ostiones se les coloca por tiempos cortos en condiciones controladas y después son expuestos a algún estresor para su análisis, como Geffard (2007) quien expuso a larvas de *C. gigas* a metales por 24 horas e inmediatamente después de su metamorfosis los evaluó; Karouna-Renier (2007) recolectaron *C. virginica* de Pensacola, Florida, Estados Unidos, y los evaluó de manera inmediata después de una corta exposición a 17 dioxinas y furanos, mercurio, arsénico, cadmio, cromo, cobre, plomo, níquel, selenio, estaño y zinc; e Ivanina (2008b) quien analizó *C. virginica* adquiridos en una granja y expuestos a condiciones controladas por tres días para evaluar el estrés oxidante. Este hallazgo resulta interesante debido a que se demuestra que las condiciones en las que se mantuvieron fueron óptimas y en estudios posteriores se podrán adaptar para contar con organismos testigo y control positivo.

CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS.

Los promedios de peso y talla de las muestras fueron $58\pm 5.2\text{g}$, $51\pm 7.1\text{g}$ y $59\pm 9.1\text{g}$; $7.40\pm 1.0\text{cm}$, $6.8\pm 0.6\text{cm}$ $8.16\pm 1.5\text{cm}$ en las épocas de Secas (2013), Nortes (2014) y Nortes (2016), respectivamente. Los datos se analizaron mediante ANOVA de 1 vía sin encontrar diferencias estadísticamente significativas con un intervalo de confianza de 95% ($p < 0.05$) entre los pesos y tallas de los individuos analizados.

Discusión de Caracterización de las Muestras.

El ostión *C. virginica* vive desde el Golfo de St. Lawrence en Canadá hasta el Golfo de México, el Caribe y las costas de Brasil y Argentina (Kennedy, 2009). Debido a la variedad de ecosistemas en los que *C. virginica* se desarrolla es posible encontrar diferencias en su talla, rendimiento y peso que podrían estar relacionadas con los parámetros físico-químicos que se encuentran en el medio en el momento de la recolección, Betanzos-Vega (2016) realizaron la caracterización de *C. virginica* como un recurso natural explotable en las cuencas de los ríos Cuyaguaje y Cauto de Cuba y reportaron las tallas utilizadas como comerciales entre 6.11 ± 2.35 cm con una talla máxima de 14.50 cm; Cherkasov (2006) recolectó ejemplares de *C. virginica* con tallas de 7 a 12 cm, en New River, North Carolina, Estados Unidos, como observamos son muy similares a las reportadas en este estudio.

EXPRESIÓN GENÉTICA.

A partir de tejido de manto de ostiones recolectados en la época de Secas (2013); adquiridos en la cooperativa local (COO) y control negativo (CN) se obtuvo un rendimiento de RNA de 0.98; 0.98 y 1.16 mg/tejido, así como una pureza A_{260}/A_{280} de 2.04; 2.11 y 2.03, respectivamente (Tabla 5).

Tabla 5. Rendimiento de RNA en tejido de ostiones de la época de Secas, COO y Control negativo.

Muestra	Tejido procesado (mg)	Concentración de RNA (ng/μl)	Rendimiento RNA por mg/tejido (μg)	Pureza A_{260}/A_{280}
Secas	18.00	97.90	0.98	2.04
CN	26.00	98.90	0.98	2.11
COO	20.00	116.30	1.16	2.03
Músculo (ratón)*	30.00	22.00	0.73	2.10
Páncreas (rata)*	30.00	100.00	3.50	1.90
Hojas de tomate*	30.00	4.60	0.15	2.00

* Datos del fabricante de kit de extracción de RNA.

Los productos de amplificación del cDNA de los organismos fueron visualizados en geles de agarosa. La expresión de los genes β -Actina y Hsp70, fue variable en las muestras estudiadas. En la Figura 7 se observa la amplificación de β -Actina y Hsp70 de las muestras.

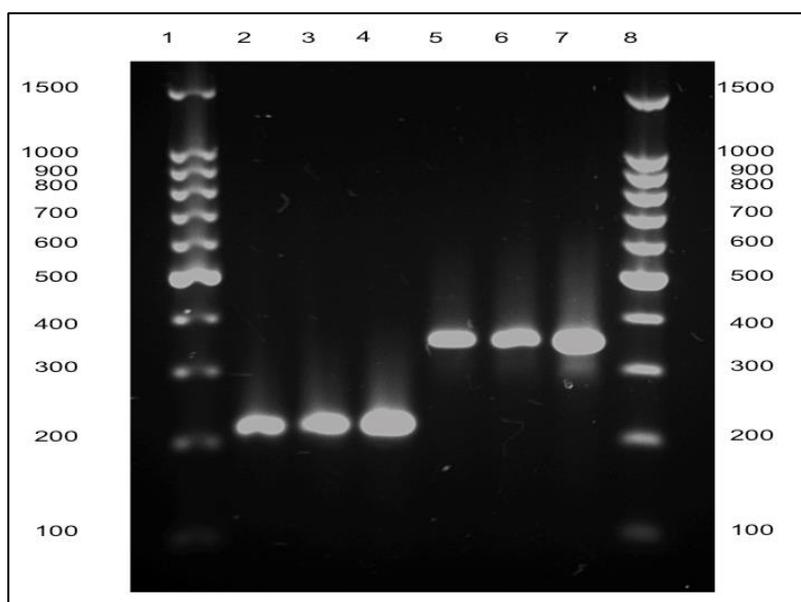


Figura 7. Amplificación de genes de Hsp70 y de β -Actina de muestras de manto de ostiones de Tampamachoco. Marcador de peso molecular: carriles 1 y 8. Amplificación de Hsp70: carriles 2, 3, y 4. Amplificación de β -Actina: carriles 5, 6 y 7. Laguna, Control negativo y Cooperativa, respectivamente.

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.

La expresión de los genes se analizó con el programa ImageJ y se determinó la intensidad relativa de β -Actina y Hsp70 para cada muestra (Tabla 6). Los genes de β -Actina y Hsp70 de la Cooperativa se expresaron con mayor intensidad (que los del Control Negativo y de la Laguna).

Tabla 6. Expresión de los genes de Actina y Hsp70 en ostiones del Control Negativo, Cooperativa y Laguna de Tampamachoco.

	Actina		HSP	
	Expresión β -Actina UIR	Relación al C-Neg (# veces)	Expresión Hsp70 UIR	Relación al C-Neg (# veces)
C-NEG	2.5170		2.4684	
LAGUNA	2.5227	1.0022	2.4459	0.9909
COO	3.3194	1.3188	3.2717	1.3255

UIR = Unidades de Intensidad Relativa.

En la Figura 8 se observa que la expresión de los genes de β -Actina y de Hsp70 del control negativo y de la Laguna exhiben una intensidad relativa aproximadamente un tercio menor que los genes de la Cooperativa.

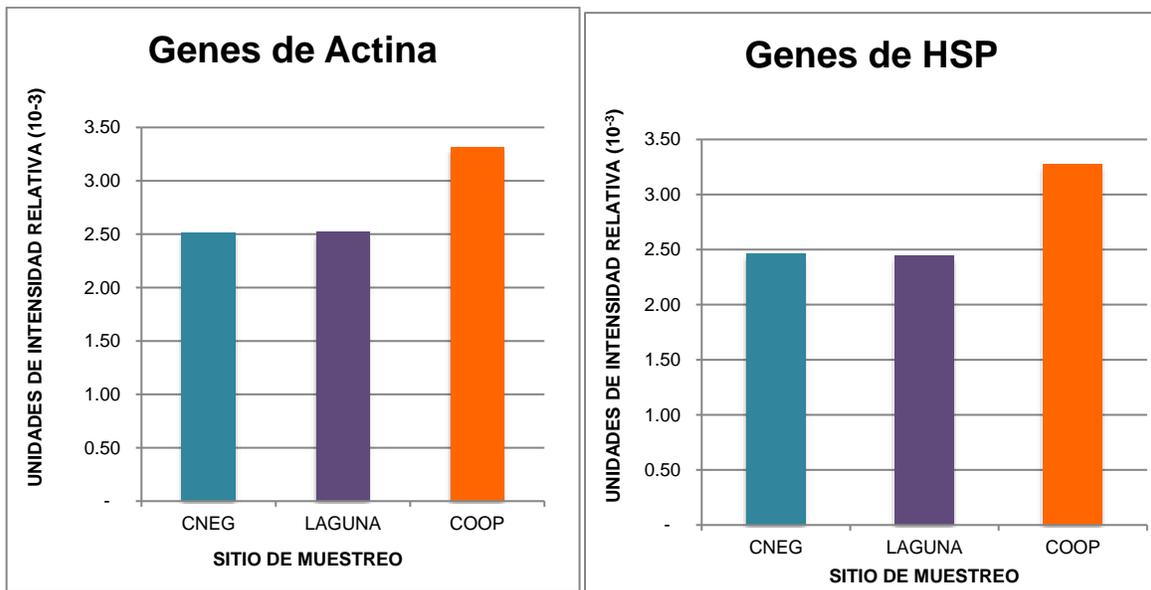


Figura 8. Gráficas de Unidades de Intensidad Relativa de la expresión de los Genes de Actina y Hsp70 en ostiones (Control Negativo, Cooperativa y Laguna Tampamachoco).

Posteriormente se calculó la relación entre la expresión de la β -Actina y las Hsp70 de cada muestra obteniendo porcentajes de 98; 97 y 99% de Hsp70 con relación al gen constitutivo, en el Control Negativo, Laguna y Cooperativa, respectivamente Tabla 7.

Tabla 7. Relación de la expresión Hsp70/Actina en muestras de manto de ostión del Control Negativo, Cooperativa y Laguna Tampamachoco.

Muestra	Actina	HSP	Relación HSP/Actina
C-NEG	2.5170	2.4684	98%
LAGU	2.5227	2.4459	97%
COO	3.3194	3.2717	99%

Discusión Expresión Genética.

Ait-Aissa (2000) sostiene que las proteínas mal plegadas constituyen la señal que induce la transcripción de las HSP; aunque, en los organismos marinos,

particularmente en bivalvos, la secuencia de los genes no se ha completado, en *C. gigas*, en *M. Edulis*, *M. Galloprovincialis* y en *C. hongkongensis* se han demostrado la síntesis de Hsp y la inducción de termotolerancia (Boutet *et al.*, 2003b; Franzellitti y Fabbri, 2005; Zhang y Zhang, 2012), en este estudio se demostró la síntesis de las HSP de manera diferencial en *C. virginica* provenientes de diferentes ambientes.

Franzellitti (2005) analizó la expresión de los genes Hsc70 y Hsp70 en *Mytilus galloprovincialis* bajo condiciones óptimas y reportó que los niveles basales de las Hsc70 fueron comparables con los de actina sugiriendo que estos pueden ser transcritos en ausencia de algún estresor; en este estudio únicamente se analizaron los genes de Hsp70 y se reporta que la intensidad de la expresión de estos genes en los ostiones del Control negativo y de la Laguna son similares mientras que la expresión de los genes de la Cooperativa es 1.3 veces mas elevada.

Sanni (2008) y Farcy (2009) mencionan que algunos genes constitutivos pueden mostrar niveles variables de expresión en condiciones especiales y sesgar los resultados pero se utilizan como referencia para normalizar la expresión de genes de interés; en este análisis se observó la expresión del gen constitutivo de β -Actina de manera diferencial entre las muestras con una expresión de 98, 97 y 99 % de intensidad relativa de las Hsp70 en relación con la expresión del gen de Actina, en las muestras de Control Negativo, Laguna y Cooperativa, respectivamente.

Zhang (2012) señala que el mRNA de Hsp70 fue transcrito de manera abundante en diferentes órganos de *C. hongkongensis* cuando se expusieron a estrés térmico, y disminuyó gradualmente cuando las proteínas fueron normalmente replegadas o eliminadas por lo que la expresión de las HSP70 se puede usar como biomarcador; sin embargo, su respuesta a los factores de estrés ambiental cuenta con poca evidencia disponible a nivel de mRNA, en este estudio se evidencia la expresión del mRNA de las Hsp70 en muestras de branquia de ostión del Control Negativo y de la Laguna son similares lo que se puede explicar debido a que las condiciones controladas fueron semejantes a las condiciones naturales mientras que las muestras de la Cooperativa estuvieron sometidas a un estrés mayor pues fueron extraídas de su ambiente y depositadas primero en la lancha del pescador, luego en tinas todo esto bajo el rayo del sol y sin agua, lo que provoca que los factores ambientales naturales fueran completamente alterados.

En este punto se demostró que las Hsp70 expresan diferencialmente en los ostiones; sin embargo, no se conocía si alguna isoforma estaba presente, por lo que se realizaron los ensayos de PAGE-SDS, 2DE y Western Blot.

PAGE-SDS.

En una primera evaluación se analizó el patrón electroforético de proteínas solubles totales para branquias de individuos y grupos de *C. virginica* de Secas (2013), Nortes (2014) y Control Positivo. Se utilizaron concentraciones de 30µg de proteínas en cada pozo para el corrimiento electroforético; sin embargo, se desplegaron diferentes patrones de bandas entre las muestras (Figura 9 y Figura 10).

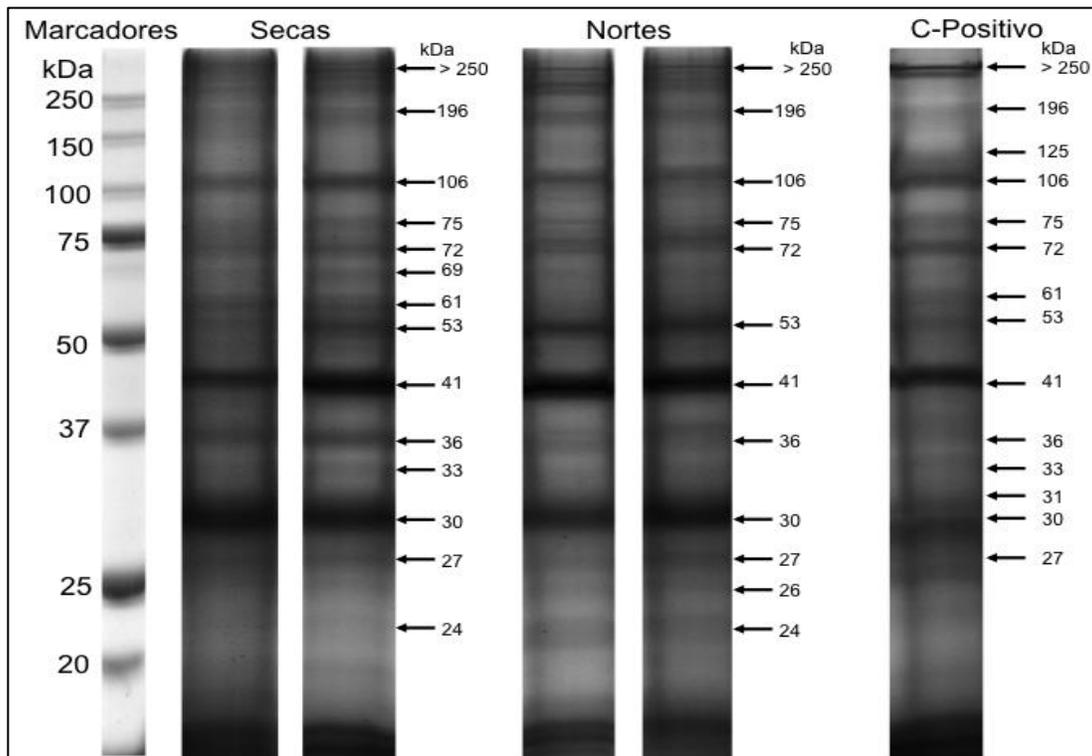


Figura 9. Patrón electroforético de branquias de proteínas solubles totales de individuos de *C. virginica*. La primera línea representa el marcador de pesos molecular. Cada línea representa el patrón electroforético representativo de un individuo.

En las muestras individuales las bandas de 125 y 31 kDa fue observada solo en el Control Positivo; una banda de 69 kDa aparece solo en las muestras de Secas; y

una banda de 26 kDa solo apareció en las muestras de Nortes. Dos bandas de 61 y 33 kDa se observa en muestras de Secas y Control Positivo mientras que la banda de 24 kDa apareció en las épocas de Secas y Nortes.

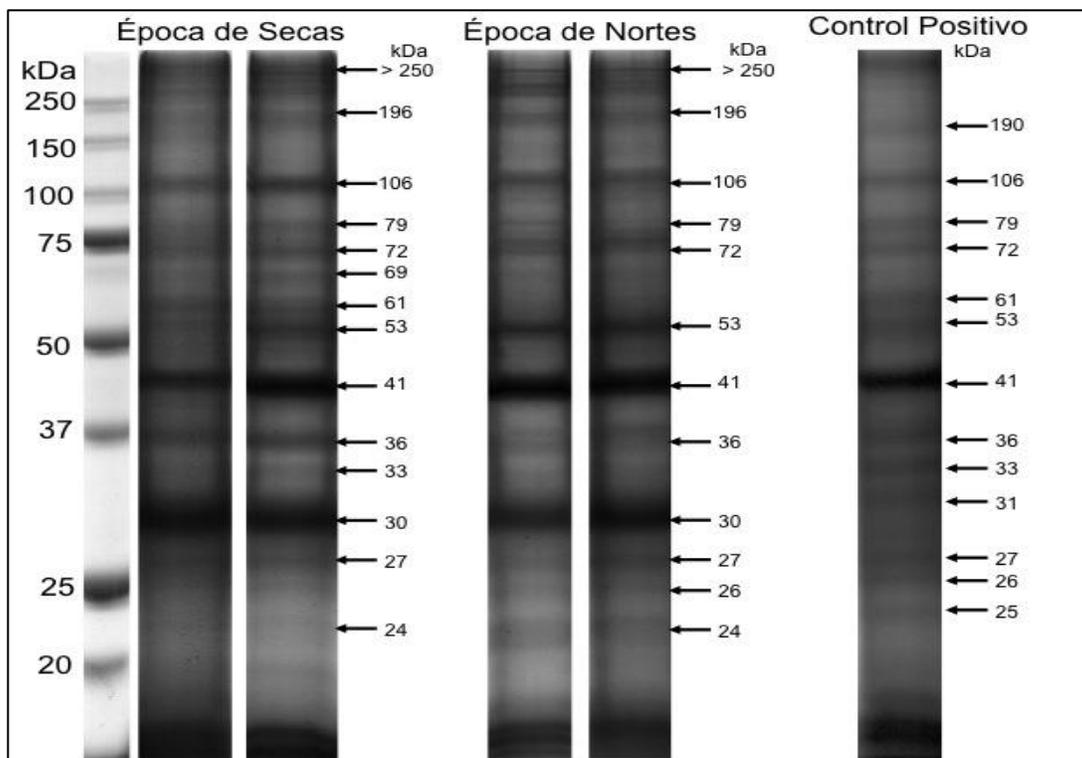


Figura 10. Patrón electroforético de branquias de proteínas solubles totales de grupos de cinco individuos de *C. virginica*. La primera línea representa el marcador de pesos molecular. Cada línea representa el patrón electroforético representativo de un grupo de cinco individuos.

En las muestras agrupadas los patrones electroforéticos también resultaron diferentes. Las bandas de > 250; 196; 30 y 24 kDa se presentaron en las muestras de Secas y Nortes. En el control Positivo se presentan las bandas de 190 y 25 kDa; en época de Secas se presenta una banda de 69 kDa; en época de Secas y Control Positivo se presentaron las bandas de 61 y 33 kDa y en época de Nortes y Control Positivo se presentó una banda de 26 kDa.

Algunas bandas observadas en una muestra individual o grupal pertenecientes a la misma estación difieren del resto de las muestras, lo que se puede apreciar claramente en la Tabla 8.

Tabla 8. Bandas observadas en la PAGE de muestras individuales y agrupadas de proteínas solubles totales de branquia de ostión.

Peso Molecular kDa	ESTACIÓN DE RECOLECTA		CONTROL
	Época de Secas	Época de Nortes	
125	—	—	Individuos
69	Individuos y Grupos	—	—
61	Individuos	—	—
33	Individuos	—	Individuos
26	—	Individuos y Grupos	—
24	Individuos	Individuos	—

PAGE-SDS CON ÓRGANOS.

Las proteínas solubles totales de glándula digestiva (GD), branquia (BR) y manto (MT) de los ostiones recolectados en época de nortes de 2016 fueron analizadas en grupos de 5 individuos utilizando la PAGE con geles de gradiente de 6-20% (Figura 11).

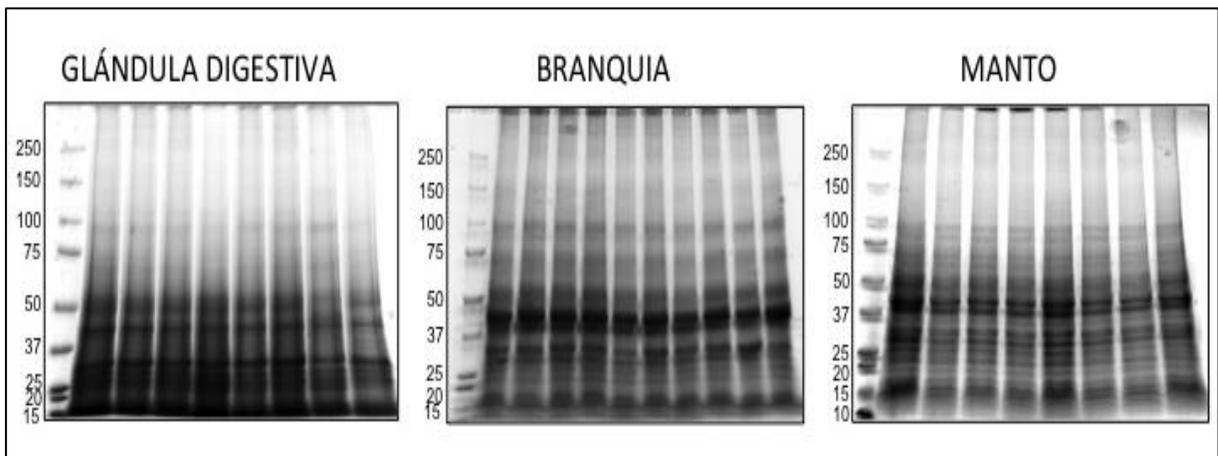


Figura 11. SDS-PAGE de tres diferentes órganos de grupos de ostiones recolectados en la época de Nortes 2016.

En los geles representativos de los tres órganos se observan los diferentes patrones electroforéticos de proteínas solubles totales; sin embargo, existen bandas cercanas a los 100, 75, 50, 42, 37 y 25kDa y con pesos menores a 20kDa que son similares en todas las muestras (Figura 12).

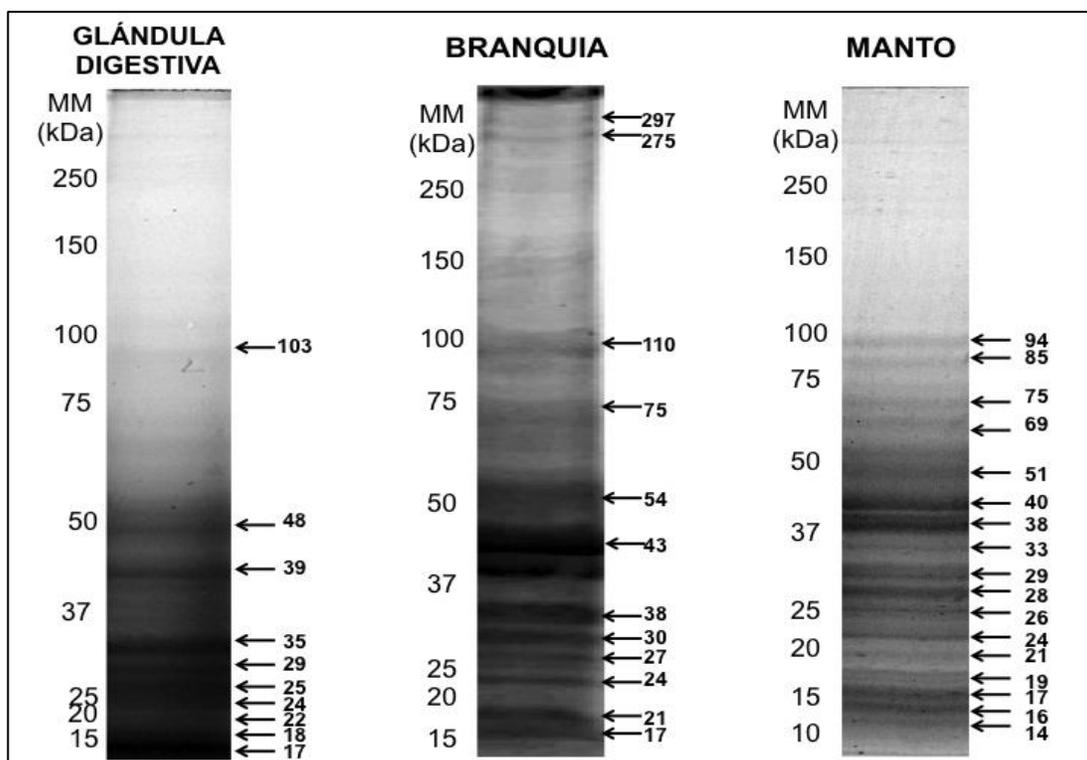


Figura 12. Comparativo de muestras de órganos de ostiones recolectados en la época de Nortes 2016.

Al analizar la masa molecular expresada en los geles, se observa que existe mayor presencia de proteínas en el intervalo de 50-15kDa (Tabla 9).

Tabla 9. Comparativo de patrón electroforético de proteínas solubles totales observadas en tejidos de Glándula Digestiva, Branquia y Manto de ostiones recolectados en la época de Nortes 2016.

INTERVALO Masa Molecular	Glándula Digestiva	Branquia	Manto
> 250		297; 275	
100-149	103	110	
75-99		75	94; 85; 75
50-74		54	69; 51
37-49	48; 39	43; 38	40; 38
25-36	35; 29; 25	30; 27	33; 29; 28; 26
20-24	24; 22	24; 21	24; 21
< 19	18; 17	17	19; 17; 16; 14
NÚMERO BANDAS EXPRESADAS	10	12	17

En todas las muestras se ubicaron las proteínas de 39/38; 24; 22/21 y 17 kDa, en este caso se podría tratar de proteínas constitutivas. De manera independiente a las otras muestras aparecen las bandas de GD: 103; 48; 35; 25 y 18 kDa; BR: 297; 275 110; 54; 43; 30 y 27 kDa; MT: 94; 85; 69; 51; 33; 28; 26; 19; 16 y 14 kDa.

Discusión PAGE-SDS.

Al comparar las PAGE de las muestras de ostión de las épocas de Secas y Nortes se observaron diferentes patrones de expresión de proteínas independientemente de la muestra (individuales o agrupados) o de la estación.

En las muestras del Control Positivo se expresaron las bandas de 125 y 31 kDa (individuales) y 190 y 25 kDa (agrupadas), que no se expresaron en los organismos silvestres; inversamente, las bandas de 24 kDa (individuos) y 250; 296; 30 y 24 kDa (agrupados) se expresaron en los organismos silvestres y no en el Control Positivo por lo que podría suponerse que estas proteínas se inhibieron o expresaron por causa de algún estresor diferente al térmico.

A los 69 kDa se conoce una proteína que responde al choque térmico y se expresó en las muestras de la época de Secas (individuales y agrupados) cuando la temperatura del agua fue mas cálida; de igual manera, se puede sugerir que este estresor indujo las bandas de 61 y 33 kDa que se expresaron en las muestras individuales y agrupadas expuestas a estrés térmico durante la época de Secas y Control Positivo.

Al comparar los órganos por medio de PAGE se encontró que en el MT se pudieron observar 1.7 y 1.4 veces más proteínas que en la GD y BR. El MT de los ostiones es un órgano que tiene el primer contacto con el ambiente que rodea al animal, por lo que cuenta con una serie de receptores que a través de una cascada de señalización inducen la síntesis de proteínas.

A diferencia de este análisis en el que se comparan las expresiones entre épocas climáticas y órganos de los ostiones, los autores que han realizado trabajos de SDS-PAGE con proteínas de ostión en general han aislado una proteína de interés y posteriormente llevan a cabo la electroforesis; por ejemplo, Umayaparvathi et al. (2013) aislaron una enzima de aproximadamente 66 kDa de la bacteria *Bacillus cereus* SU12 a partir del ostión *Saccostrea cucullata* con fines biotecnológicos para producir la producción industrial de proteasas extracelulares; Vasquez (2013) reportan una glicoproteína de 55 kDa resistente al calor y soluble en ácido que forma parte de la matriz orgánica de las larvas de *C. gigas* actúa como señal para la cementación de las larvas del ostión, reconociendo a los individuos de su propia especie o especies relacionadas, lo que tiene una aplicación en la acuicultura de esta especie.

INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO DE LA FAMILIA DE LA HSP70.

La inmunodetección de proteínas de branquia de ostión demostró la presencia de tres isoformas, HSP73, HSP72 y HSP69, en organismos individuales y agrupados;

aunque, las primeras dos se expresaron en todas las muestras, la HSP69 solo se expresó únicamente en muestras individuales y agrupadas de la estación de Secas (Figura 13).

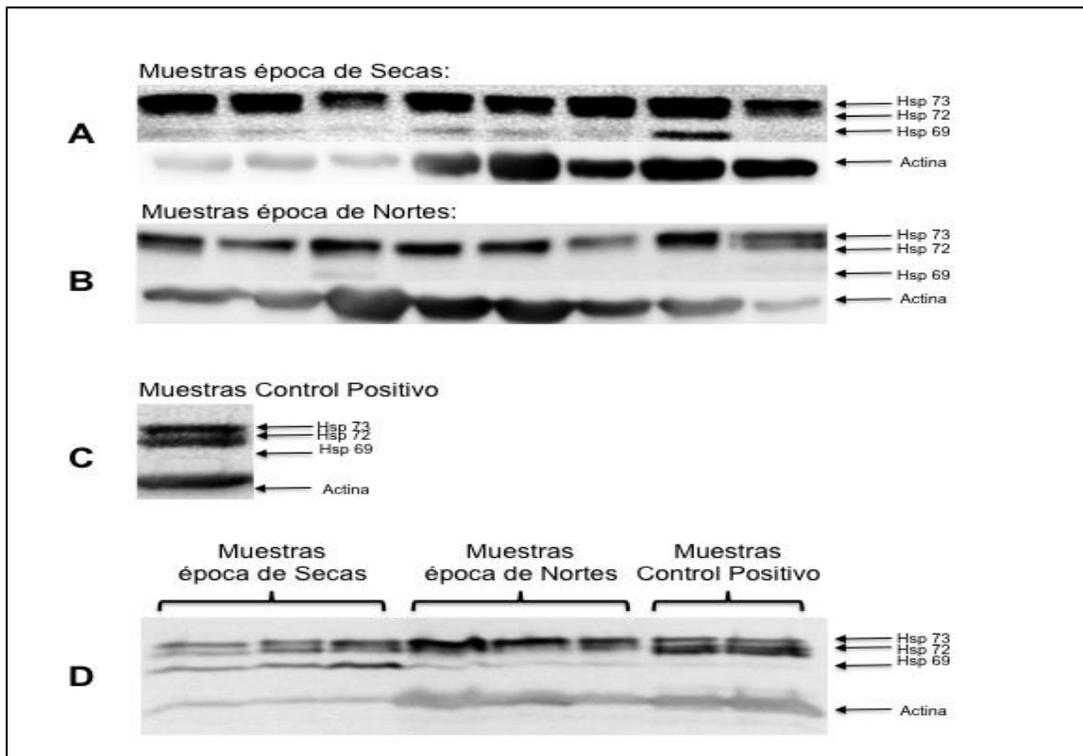


Figura 13. Inmunodetección de proteínas de estrés HSP-70 en branquias de ostiones recolectados en épocas de secas 2013, nortes 2014 y Control Positivo. En las muestras individuales de los ostiones de la época de secas (A) se expresaron las isoformas HSP-73, HSP-72 y HSP-69, mientras que en época de nortes (B) y Control Positivo (C) la isoforma HSP-69 estuvo ausente. En muestras agrupadas para las mismas condiciones se observan los mismos resultados (D).

Variación estacional de niveles de expresión de HSP.

Para obtener la intensidad de las bandas obtenidas por inmunodetección se llevó a cabo un análisis semi-cuantitativo de la expresión de las tres isoformas HSP73, HSP72 y HSP69 utilizando el programa Image J (Schneider *et al.*, 2012) que se calcula mediante Unidades de Intensidad Relativa (UIR).

El promedio de las HSP73 de las muestras de individuos y grupos fue 1.30, 0.52, 0.44, 0.40, 0.66 y 0.21 UIR, para Secas, Nortes y CP respectivamente (Figura 14). Las muestras individuales de la época de Secas y CP mostraron mayor expresión que las demás.

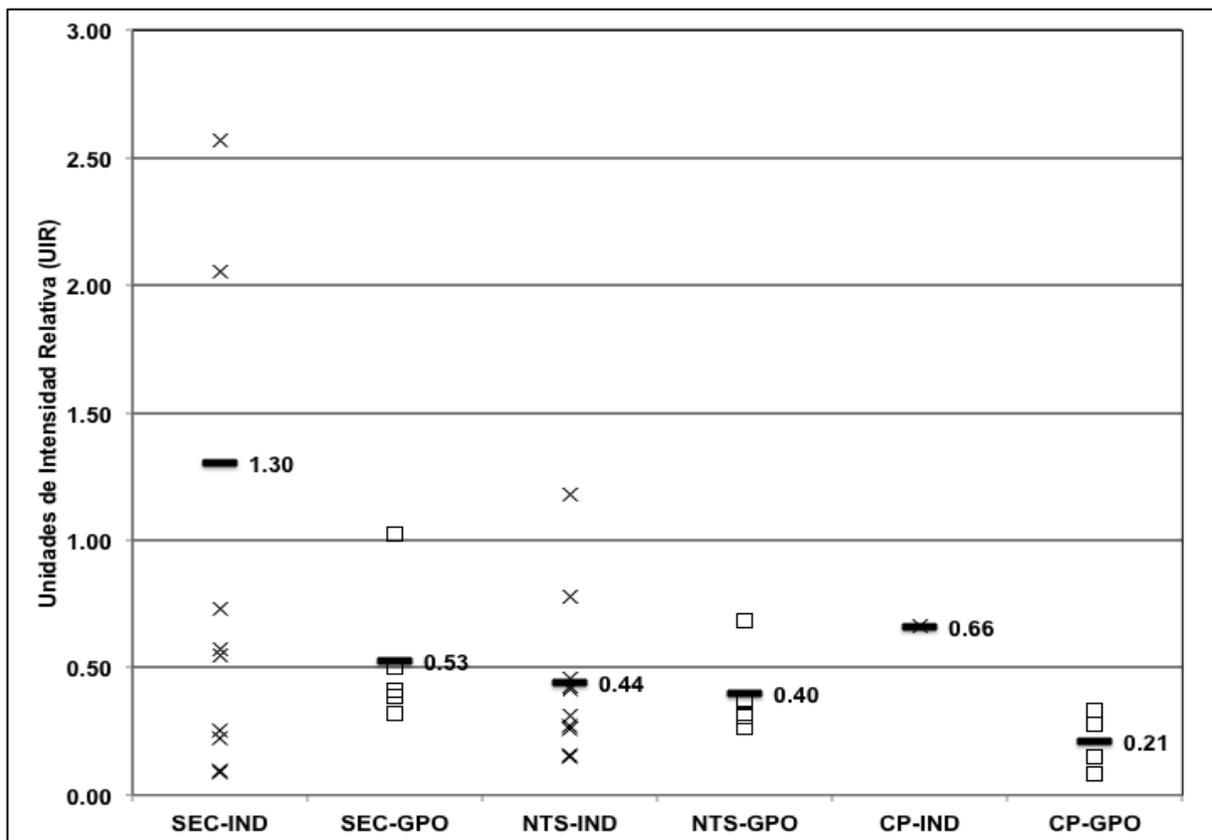


Figura 14. Representación gráfica del análisis semi-cuantitativo de la expresión de la isoforma HSP-73. Se observan muestras individuales y agrupadas de las épocas de secas, nortes y CP.

El promedio de HSP72 de muestras individuales y agrupadas fue de 0.19, 0.66, 0.09, 0.33, 0.42 and 0.20 RIU en Secas, Nortes y CP respectivamente (Figura 15). Las muestras agrupadas de la estación de Secas y las individuales de la CP mostraron mayor expresión que las demás.

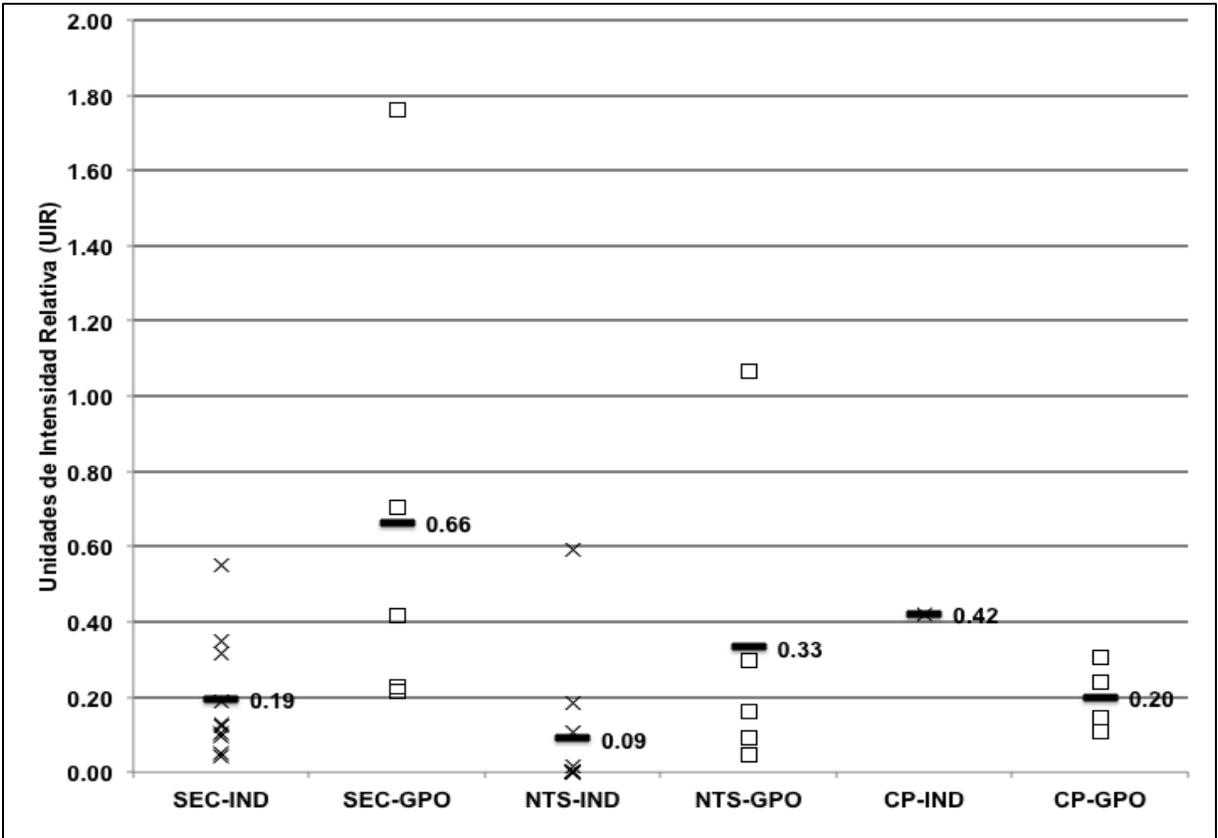


Figura 15. Representación gráfica del análisis semi-cuantitativo de la expresión de la isoforma HSP-72. Se observan muestras individuales y agrupadas de las épocas de secas, nortes y CP.

El promedio de HSP69 de muestras individuales y agrupadas fue de 0.04, 0.67, 0.01, 0.01, 0.00 and 0.00 RIU, en Secas, Nortes y CP respectivamente (Figura 16). Esta isoforma se expresó en el 50% y 100% de las muestras individuales y agrupadas, respectivamente de la época de Secas y su expresión en las otras muestras no fue significativa.

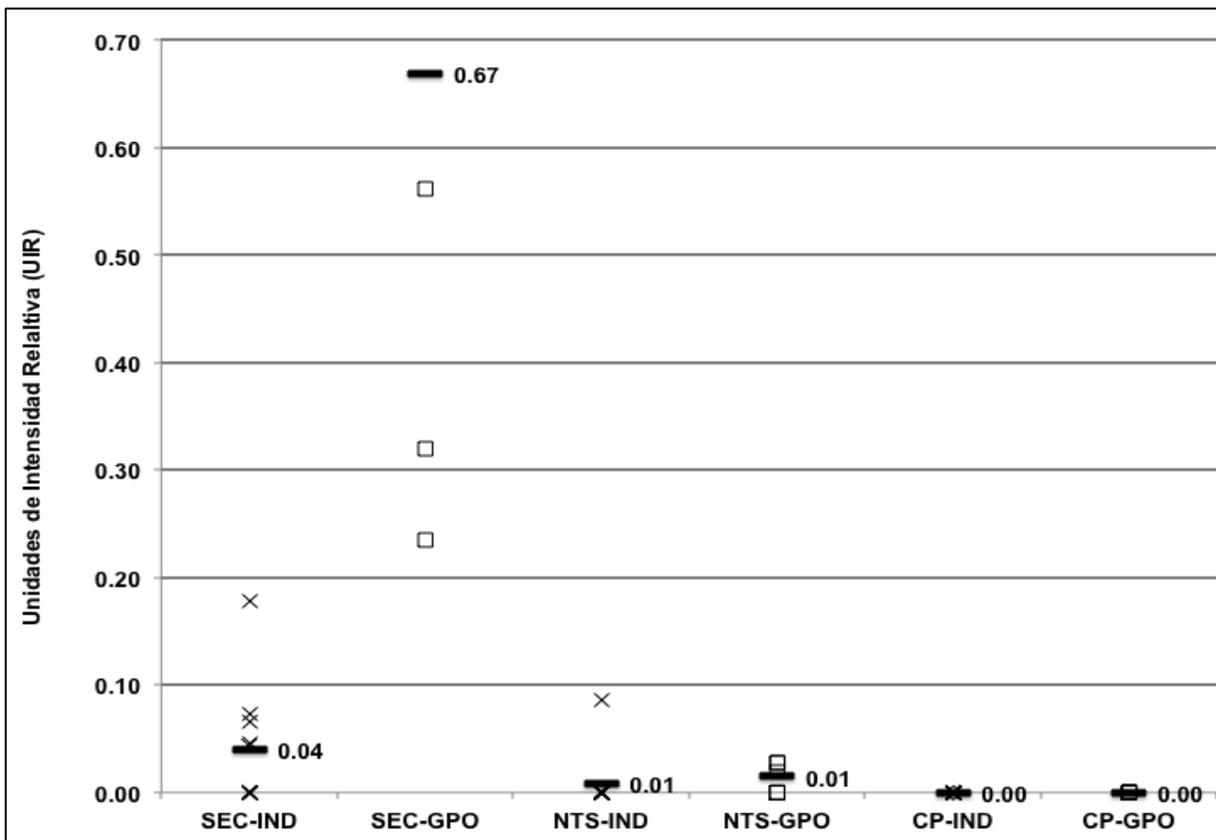


Figura 16. Representación gráfica del análisis semi-cuantitativo de la expresión de la isoforma HSP-69. Se observan muestras individuales y agrupadas de las épocas de secas, nortes y CP.

Estadísticamente la expresión de HSP73 y HSP72 no mostró diferencias significativas entre las estaciones o las muestras individuales o agrupadas; sin embargo, la expresión de la HSP69 en muestras individuales y agrupadas fue significativamente diferente en la época de Secas en comparación con las demás muestras, todo lo anterior con una significancia estadística de 95% ($p=0.05$).

Discusión Inmunodetección.

La expresión de las HSP ha sido estudiada como un biomarcador de estrés en ostiones. Snyder (2001) examinó las respuestas de *Mytilus galloprovincialis* y

Haliotis rufescens expuestos a estrés térmico, petróleo degradado, heptacloro, fenobarbital, β -naftoflavonas y peptaclorofeno; Hamdoun (2003) evaluó las proteínas HSP y la expresión de los genes *hsp* como respuesta a estrés térmico en *Crassostrea gigas*; y Piano (2002) evaluó la expresión de las proteínas HSP en *Ostrea edulis* expuestos a estrés térmico. Todos estos estudios analizaron la expresión de las proteínas HSP de organismos expuestos a un estresor específico, pero ninguno las analizó de ostiones en condiciones naturales.

En este estudio encontramos la expresión de tres isoformas (HSP73, HSP72 y HSP69) recolectadas en dos estaciones climáticas diferentes de un sitio reportado con baja contaminación (Botello *et al.*, 2016), con concentraciones que relativamente no afectan a los organismos bentónicos (Long *et al.*, 1995). Es posible que estas expresiones hayan sido generadas debido a las fluctuaciones de los parámetros físico-químicos, particularmente las HSP69, pues esta se expresó únicamente en la estación de Secas cuando la salinidad (31 UPS) y el oxígeno disuelto (10.1 mg/L) fueron más elevados de lo recomendado por Shumway (1996) y UNEP (2008) (14-28 UPS; y 9.5 mg/L a <20 °C, respectivamente). Además de estos parámetros, la temperatura fue de 26°C en la estación de Secas lo que de acuerdo con Abbe (2000), las temperaturas más cálidas llevan a altas y tempranas tasas de crecimiento, y el tamaño elevado en los ostiones aumenta su actividad metabólica. En las estaciones de Secas y Nortes, el pH fue de aproximadamente 8 unidades, lo que está dentro del intervalo óptimo para aguas salobres; por tanto,

este parámetro parece no haber afectado los resultados de la expresión de las HSP.

La expresión de las isoformas de la familia HSP parece ser dependiente del estresor y la especie; por ejemplo, Chapple (1997) reportaron expresión de las isoformas HSP78, HSP72 y Hsp70 en *M. edulis*, sin embargo, no determinaron si fueron constitutivas o inducidas. Snyder (2001) reportaron que las isoformas HSP74, HSP70 y HSP67 fueron inducidas en *M. galloprovincialis* y *H. Rufescens* expuestos a estrés térmico y xenobióticos. Cruz-Rodríguez (2002) identificaron que las isoformas HSP71 y la HSP69 fueron inducidas cuando expusieron a *C. virginica* a hidrocarburos aromáticos policíclicos. Hamdoun (2003) y Piano (2002) encontraron las isoformas HSP77 y HSP72 como constitutivas y la HSP69 como inducida por estrés térmico en *C. gigas* y *Ostrea edulis* respectivamente. En este trabajo la expresión de la isoforma HSP73 estuvo presente en todas las muestras, la HSP72 fue variable y la HSP69 solo se expresó en organismos individuales y agrupados de la estación de Secas. La isoforma HSP73 no ha sido reportada previamente en adultos de *C. virginica*.

Boutet (2003b) encontraron una relación inversa entre la expresión de las HSP70 y la concentración de metales en *C. gigas*. En otras especies de bivalvos, Piano (2004) reportaron que después de la exposición a estrés térmico, las isoformas inducidas no se expresaron en *M. galloprovincialis*, *Tapes phillipinarum* y *Scapharca inaequalvis*; sin embargo, las isoformas constitutivas fueron significativamente elevadas. La expresión de las HSP de los ostiones Control

Positivo expuestos a estrés térmico fue menor que la de los ostiones silvestres. De particular interés es la expresión de la HSP69 durante la época de Secas, en la que más del 50% de los ostiones individuales y agrupados se expresó, sin perder de vista el hecho de que la contaminación ha disminuido gradualmente (Botello *et al.*, 2016). Esta expresión también fue observada por Piano (2002) en *O. edulis* y Hamdoun (2003) en *C. gigas*, quien propuso que esta isoforma fue inducida por estrés térmico; mientras que Cruz-Rodríguez (2002) la reportó en *C. virginica* como respuesta a la exposición de hidrocarburos aromáticos policíclicos.

ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (2DE).

Para estandarizar el método se utilizó una muestra al azar de proteínas solubles totales de branquia de ostiones de la Laguna Tampamachoco utilizando un gel IPG con un intervalo de pH de 3 a 10 unidades y un SDS-PAGE con 10% de acrilamida (Figura 17) en el que se observa que la mayor concentración de proteínas se encuentran en el intervalo de 3 a 7 unidades de pH y peso molecular entre 100 y 25kDa.

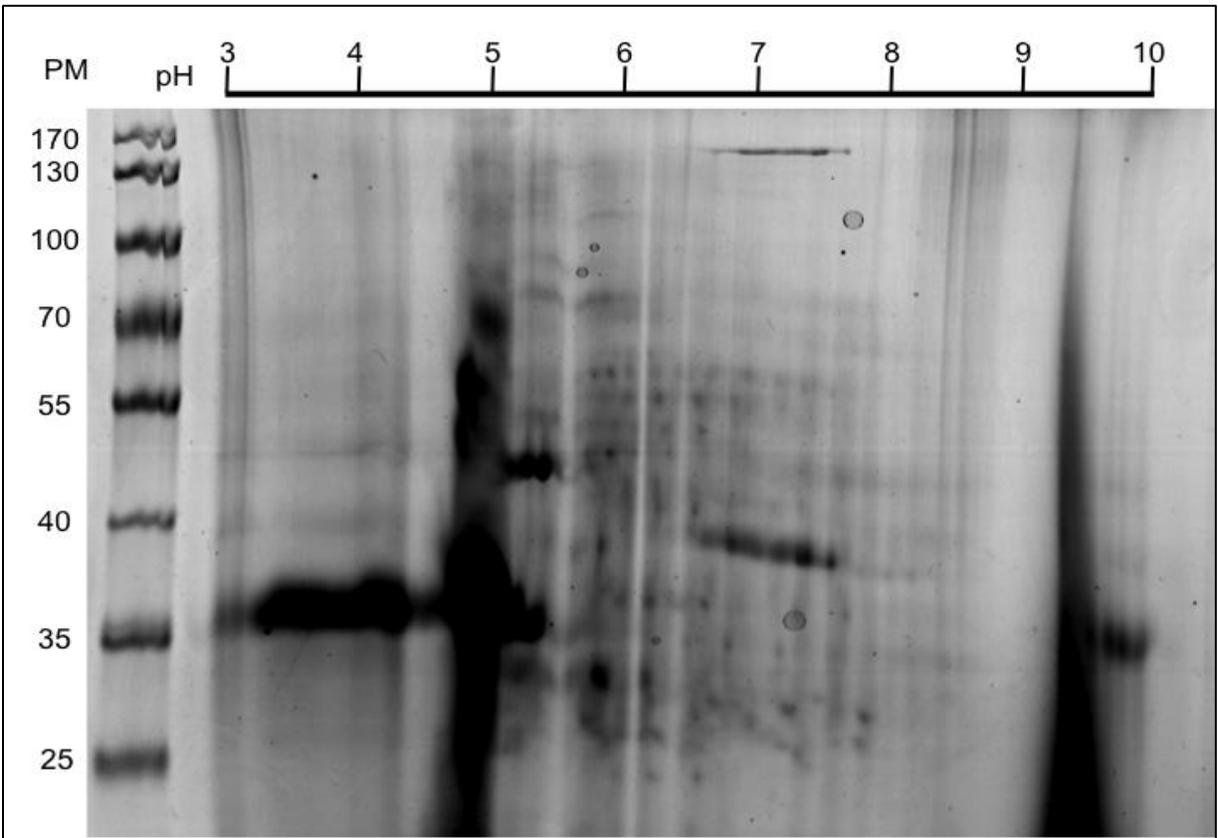


Figura 17. Estandarización de 2DE de proteínas totales de branquia de ostión recolectado en época de Nortes 2014, con gel IPG de intervalo de pH de 4-7 y masa Molecular de 250-25kDa.

Una vez realizada la estandarización se realizaron ensayos por duplicado de cada época o sitio de muestreo con un gel IPG de intervalo 4-7 de pH y mM de 170-25kDa, en los que se encontraron cinco spots (1; 2; 3; 4 y 5) con ubicación similar dentro de los geles en todas las muestras, por lo que fueron analizados de manera independiente.

En lo subsecuente se denominará a las muestras Nortes, Secas, Mandinga, Alvarado, Control Positivo y Control Negativo.

Perfil de Expresión de Proteínas.

El análisis de los geles 2DE se realizó dividiendo cada gel en cuadrantes y numerando los spots dentro de cada cuadrante, posteriormente se calculó su mM en el intervalo de 151 y 24kDa y pI en el intervalo de 4.27 a 6.94 de pH, tomando como referencia el gel de Alvarado debido a que presentó una mayor expresión de proteínas.

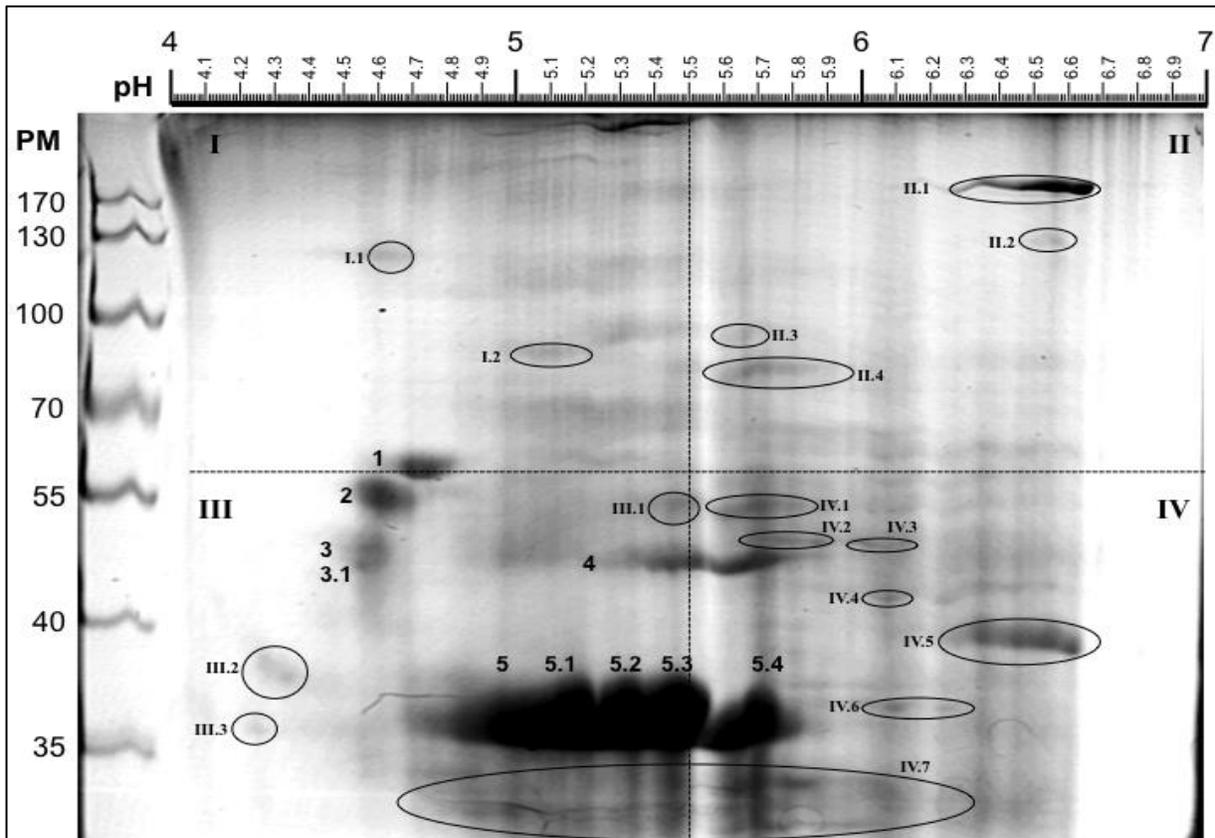


Figura 18. Gel 2DE representativo de branquia de ostiones recolectados en la Laguna Tampamachoco en la época de Nortes 2014.

En la Figura 18 se muestra un gel 2DE representativo de branquia de ostiones recolectados en la Laguna Tampamachoco en la época de Nortes 2014, se

pueden observar alrededor de 23 proteínas expresadas en cúmulos o de manera individual particularmente en esta época se encuentran los Spot 3.1; 5.1 a 5.4.

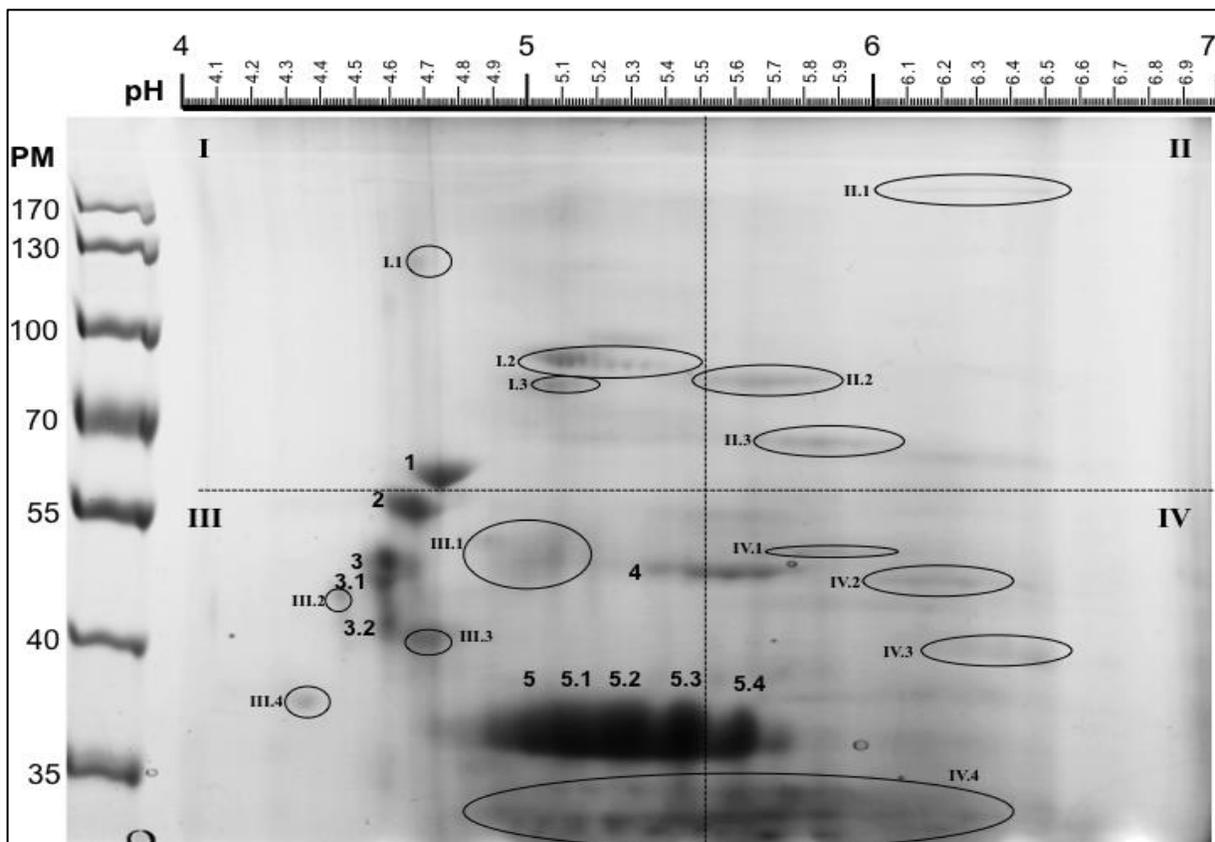


Figura 19. Gel 2DE representativo de ostiones recolectados en la Laguna Tampamachoco en la época de Secas 2013.

En la Figura 19 se muestra un gel 2DE representativo de branquia de ostiones recolectados en la Laguna Tampamachoco en la época de Secas 2013, se pueden observar alrededor de 26 proteínas expresadas en cúmulos o de manera individual, particularmente en esta época se encuentran los Spot 3.1-3.2; 5.1 a 5.4.

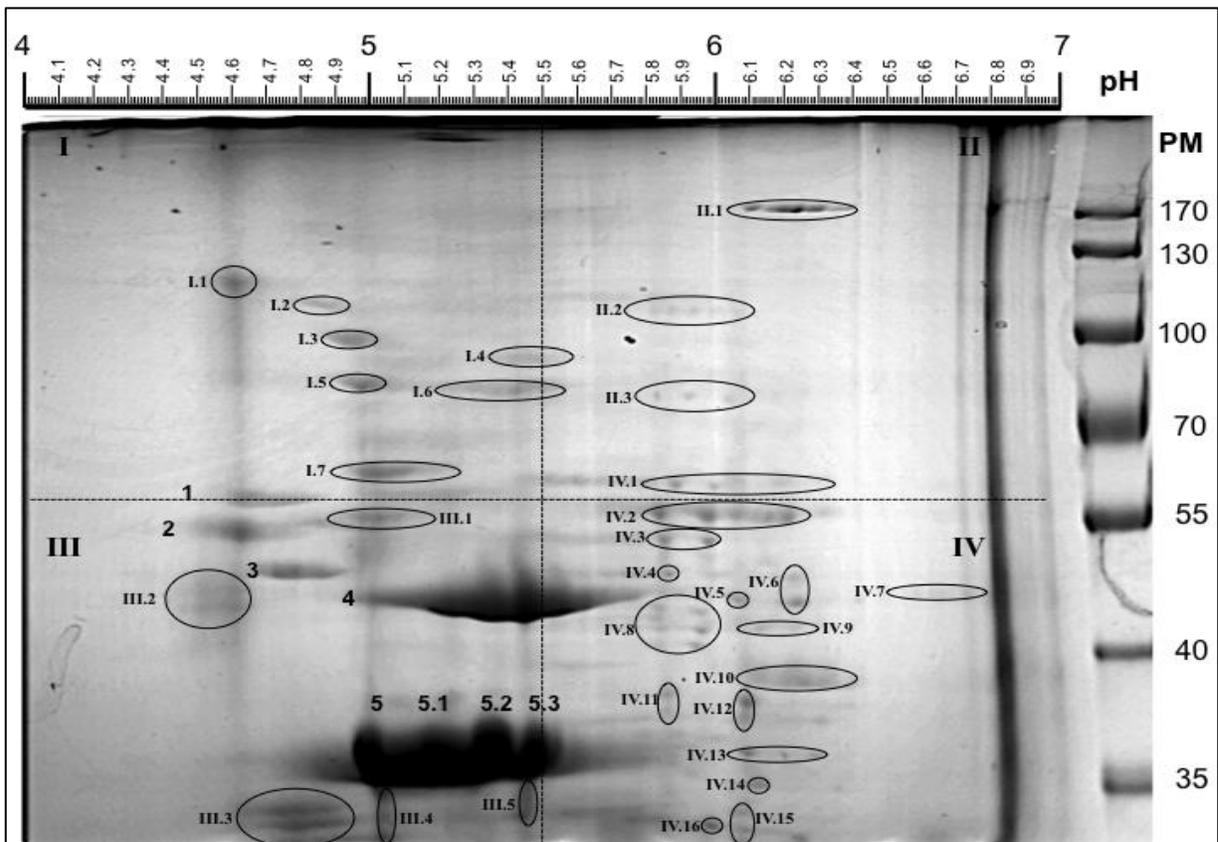


Figura 20. Gel 2DE representativo de ostiones recolectados en la Laguna Mandinga en la época de Lluvias 2014.

En la se muestra un gel 2DE representativo de branquia de ostiones recolectados en la Laguna Mandinga en la época de Lluvias 2014, se pueden observar alrededor de 75 proteínas expresadas en cúmulos o de manera individual, particularmente en esta época se encuentran los Spot 5.1 a 5.3.

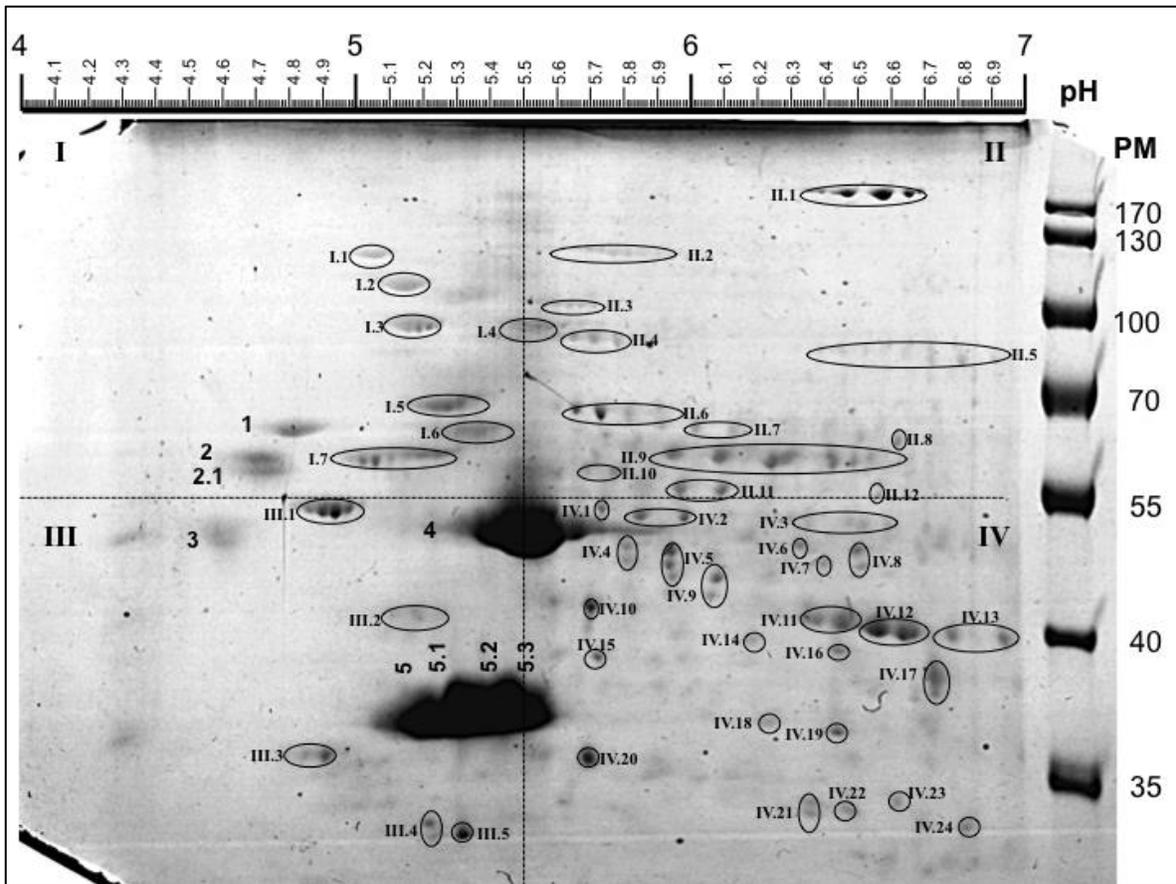


Figura 21. Gel 2DE representativo de ostiones recolectados en la Laguna Alvarado en la época de Secas 2014.

En la Figura 21 se muestra un gel 2DE representativo de branquia de ostiones recolectados en la Laguna Alvarado en la época de Secas 2014, se pueden observar alrededor de 104 proteínas expresadas en cúmulos o de manera individual, particularmente en esta época se encuentran los Spot 2.1 y 5.1 a 5.3.

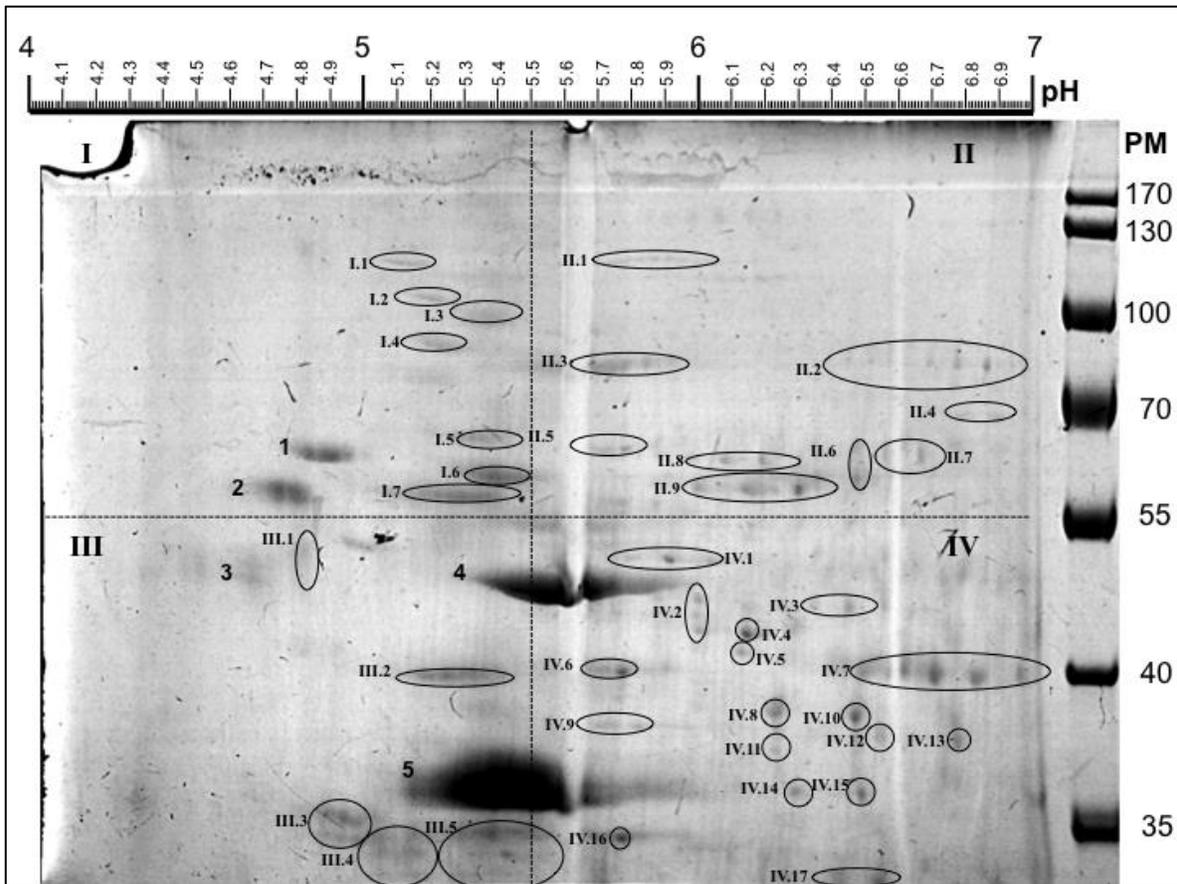


Figura 22. Gel 2DE representativo de ostiones Control Positivo en condiciones controladas de laboratorio.

En la Figura 22 se muestra un gel 2DE representativo del Control Positivo de branquia de ostiones recolectados, se pueden observar alrededor de 85 proteínas expresadas en cúmulos o de manera individual.

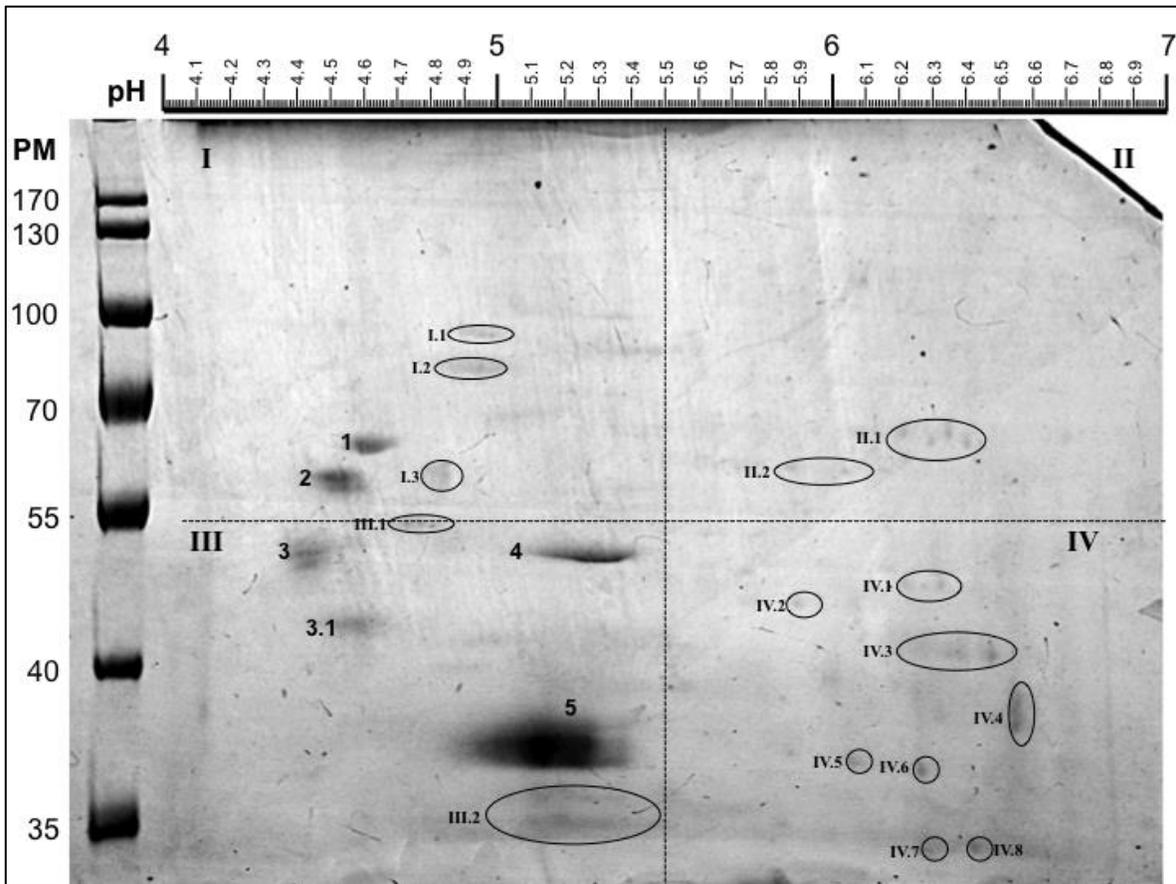


Figura 23. Gel 2DE representativo de ostiones Control Negativo en condiciones controladas de laboratorio.

En la Figura 24 se muestra un gel 2DE representativo del Control Negativo de branquia de ostiones recolectados, se pueden observar alrededor de 23 proteínas expresadas en cúmulos o de manera individual.

Se analizaron las proteínas similares y las disímiles considerando que la diferencia de mM entre los spots de un grupo no fuera mayor a 10 kDa y la de su pI no fuera mayor a una unidad de pH, además de su ubicación dentro de un cuadrante; obteniendo un total de 50 proteínas (Tabla 10) que coincidieron entre las muestras.

Tabla 10. Proteínas localizadas en las muestras de branquia de ostión de las Lagunas Tampamachoco (Nortes, Secas); Mandinga (lluvias); Alvarado (lluvias); Controles (Positivo y Negativo).

Muestra	Isoformas	Intervalo		Intervalo		Cuadrante	Observaciones
		mM		pI			
Alvarado	1	122.63	122.63	5.08	5.08	I	
C+	1	119.24	119.24	5.07	5.07		
Mandinga	1	120.26	120.26	4.89	4.89		
Nortes	1	122.67	122.67	4.56	4.56		
Secas	1	124.01	124.01	4.60	4.60		
Alvarado	1	110.45	110.45	5.17	5.17	I	
C+	3	110.21	109.13	5.21	5.15		
Mandinga	1	114.17	114.17	5.08	5.08		
Alvarado	2	100.53	99.48	5.24	5.20	I	
C+	3	97.92	96.96	5.25	5.16		
Mandinga	1	102.90	102.90	5.20	5.20		
Mandinga	1	97.69	97.69	5.64	5.64	I	
Nortes	1	94.69	94.69	4.98	4.98		
Secas	8	95.21	95.21	5.12	4.88		
C-	1	89.78	89.78	4.96	4.96	I	
C+	1	89.62	89.62	5.15	5.15		
Mandinga	1	91.79	91.79	5.22	5.22		
Mandinga	1	90.84	90.84	5.62	5.62	I	
Secas	4	88.14	88.14	4.93	4.84		
Alvarado	3	80.71	80.71	5.33	5.24	I	
C+	1	77.31	77.31	5.30	5.30		
Alvarado	1	76.59	76.59	5.36	5.36	I	
C+	1	70.75	70.75	5.34	5.34		
Alvarado	5	71.19	69.71	5.03	5.27	I	
C+	1	67.35	67.35	5.21	5.21		
Mandinga	2	71.52	71.52	5.25	5.33		
Alvarado	5	144.97	143.46	6.69	6.40	II	

Mandinga	5	146.52	146.52	6.53	6.21	
Nortes	1	150.00	150.00	6.25	6.25	
Secas	1	151.00	151.00	5.87	5.87	
Alvarado	6	122.63	122.63	5.86	5.66	II
C+	1	104.91	104.91	5.16	5.16	
Mandinga	5	109.52	109.52	6.18	5.97	
Alvarado	4	105.93	105.93	5.60	5.60	II
Nortes	1	97.94	97.94	5.53	5.53	
Alvarado	7	92.46	92.46	6.90	6.45	II
C+	6	96.96	96.96	6.86	6.44	
Alvarado	3	96.41	96.41	5.66	5.79	II
C+	4	93.22	92.31	5.67	5.84	
Mandinga	3	87.14	87.14	6.14	5.97	
Nortes	1	89.50	89.50	5.58	5.58	
Secas	1	89.12	89.12	5.47	5.47	
Alvarado	6	79.87	75.01	6.14	5.68	II
C+	1	75.80	75.80	5.77	5.77	
C-	4	77.25	74.21	6.40	6.20	II
C+	3	75.80	75.80	6.55	6.77	
Alvarado	1	72.69	72.69	6.63	6.63	II
C+	2	75.80	70.06	6.47	6.47	
Alvarado	2	70.44	69.71	6.10	5.97	II
C-^	2	70.59	70.59	6.08	5.88	
C+	3	73.60	73.60	5.97	6.18	
Alvarado	5	69.71	68.27	6.49	6.24	II
C+	6	70.06	68.02	6.33	5.99	
Mandinga	5	69.33	68.61	6.10	5.62	
Secas	1	69.94	69.94	5.53	5.53	
Alvarado	2	68.27	68.27	5.79	5.64	II
C+	1	66.04	66.04	5.86	5.86	
Mandinga	1	63.14	63.14	5.74	5.74	III
Nortes	1	59.68	59.68	5.37	5.37	
Alvarado	5	60.85	60.22	5.00	4.83	III
C-	2	61.35	61.35	4.78	4.74	
C+	1	57.54	57.54	4.78	4.78	
Secas	1	55.50	55.50	4.93	4.93	
Alvarado	2	46.85	46.85	5.15	5.09	III
C+	3	42.82	42.82	5.29	5.16	
Secas	1	42.61	42.61	4.57	4.57	
Nortes	3	39.35	32.50	4.42	4.27	III

Secas	1	35.73	35.73	4.29	4.29		
Alvarado	2	32.83	32.83	4.92	4.86	III	
C+	4	30.63	28.31	5.07	4.88		
Mandinga	3	26.10	28.07	5.04	5.04		
C-	1	28.36	28.36	6.37	6.37	III	
C+	2	29.45	27.49	5.41	5.36		
Alvarado	1	27.19	27.19	5.23	5.23	III	
Mandinga	2	27.21	26.10	5.25	5.25		
Alvarado	2	65.47	64.79	6.10	5.98	IV	
Mandinga	5	63.80	62.48	6.32	5.97		
Nortes	1	57.05	57.05	5.70	5.70		
Alvarado	1	60.85	60.85	5.75	5.75	IV	
Mandinga	1	54.02	54.02	6.00	6.00		
Alvarado	2	60.22	59.59	5.99	5.86	IV	
C+	2	57.54	57.54	5.82	5.96		
Mandinga	2	58.71	58.71	6.09	5.98		
Nortes	1	53.93	53.93	5.76	5.76		
Secas	1	54.29	54.29	5.53	5.53		
Alvarado	2	60.22	60.22	6.35	6.30	IV	*
C-	2	52.26	52.26	6.30	6.21		
C+	3	51.63	50.62	6.63	6.44		
Mandinga	3	50.76	50.76	6.73	6.56		
Nortes	1	46.07	46.07	6.07	6.07		
Secas	1	49.71	49.71	5.80	5.80		
Alvarado	2	55.38	53.67	5.82	5.81	IV	
C+	3	52.66	48.19	5.99	6.00		
Mandinga	3	46.22	49.71	5.97	5.97		
Alvarado	3	50.41	54.81	5.95	5.95	IV	
Mandinga	4	44.81	48.69	6.08	5.97		
Alvarado	1	55.96	55.96	6.27	6.27	IV	
Mandinga	1	50.23	50.23	6.16	6.16		
Alvarado	2	54.81	52.56	6.52	6.49	IV	
Mandinga	2	52.91	49.20	6.34	6.34		
Alvarado	2	50.41	48.34	6.08	6.07	IV	
C+	5	48.67	45.87	6.19	6.07		
Nortes	1	46.59	46.59	5.88	5.88		
Alvarado	1	46.85	46.85	5.71	5.71	IV	
C+	2	43.67	43.67	5.68	5.75		
Alvarado	6	44.93	43.09	6.94	6.38	IV	*
C-	2	43.63	43.63	6.46	6.32		

C+	6	44.10	44.10	6.84	6.29	
Mandinga	4	41.23	41.23	6.45	6.20	
Nortes	4	40.70	40.70	6.36	6.13	
Secas	1	39.88	39.88	6.07	6.07	
Alvarado	1	43.09	43.09	6.19	6.19	IV
C+	1	39.97	39.97	6.22	6.22	
Mandinga	2	37.55	38.74	6.00	6.00	
Alvarado	1	41.32	41.32	5.74	5.74	IV
C+	1	39.57	39.57	6.47	6.47	
Mandinga	2	37.94	36.40	6.18	6.17	
Alvarado	1	40.47	40.47	5.73	5.73	IV
C+	2	37.67	37.67	5.79	5.70	
Alvarado	2	39.22	37.22	6.73	6.73	IV
C-	2	39.08	36.43	6.54	6.54	
C+	1	36.94	36.94	6.77	6.77	
Alvarado	1	33.52	33.52	6.43	6.43	IV
C-	1	32.63	32.63	6.26	6.26	
C+	1	36.94	36.94	6.53	6.53	
Mandinga	1	30.19	30.19	6.22	6.22	
Alvarado	1	34.23	34.23	6.22	6.22	IV
C-	1	33.29	33.29	6.06	6.06	
C+	1	35.86	35.86	6.22	6.22	
Mandinga	3	32.80	32.80	6.36	6.29	IV
Nortes	2	33.99	33.99	6.03	5.91	
Alvarado	1	26.91	26.91	6.47	6.47	IV
C-	1	26.70	26.70	6.28	6.28	
C+	1	32.18	32.18	6.49	6.49	
Alvarado	1	30.83	30.83	5.69	5.69	IV
C+	1	28.88	28.88	5.74	5.74	
Mandinga	2	28.96	28.07	6.16	6.16	IV
Alvarado	2	26.35	27.19	6.35	6.35	
Alvarado	1	27.19	27.19	6.61	6.61	IV
C-	1	26.97	26.97	6.42	6.42	
Secas	3	27.13	24.03	5.53	5.53	IV
Nortes^	3	27.45	23.71	5.58	5.58	

*Expresadas en todas las muestras.

Como resultado se observaron proteínas con la misma mM y diferente pl o a la inversa; esto podría ser debido a que se presentaron modificaciones pos-

traduccionales que afectan tanto la masa molecular como el pH de la proteína, o bien tratarse de otro tipo de proteínas.

La cantidad en la expresión e intensidad de las proteínas cambia en relación con el nivel de estrés, las muestras con mayor coincidencia fueron Alvarado y Control+ con 31 proteínas similares lo que representa un 19% del total de coincidencias (Tabla 11).

Tabla 11. Relación de coincidencias entre la expresión de las muestras de branquia de ostión de las Lagunas Tampamachoco (Nortes, Secas); Mandinga (Iluvias); Alvarado (Iluvias); Controles (Positivo y Negativo).

Muestra	# Coincidencias	%
Alvarado / Control+	31	19
Alvarado / Mandinga	28	17
Control+ / Mandinga	22	14
Control+ / Control-	11	7
Alvarado / Secas	9	6
Mandinga / Norte	9	6
Alvarado / Control-	8	5
Alvarado/Nortes	8	5
Control+ / Secas	8	5
Mandinga / Secas	7	4
Nortes / Secas	7	4
Control+ / Nortes	5	3
Control- / Mandinga	4	2
Control- / Secas	3	2
Control- / Nortes	2	1
Total	162	100

En los perfiles de expresión de proteínas se presentó una diferencia de expresión entre las muestras que se observa a través de las proteínas que se expresaron de manera particular (Tabla 12).

Tabla 12. Proteínas expresadas de manera particular en las muestras de branquia de ostión analizadas por 2DE.

Muestra	mM	pI
Alvarado	108	5.36
Alvarado	57	6.18
Alvarado	27	6.80
Alvarado	26	5.32
*Control -	98	4.96
*Control -	98	4.99
Control -	50	5.90
*Control +	82	6.79
*Control +	82	6.90
Control +	32	6.29
'*Control +	30	5.03
'*Control +	30	5.12
'*Control +	28	5.03
'*Control +	28	5.12
'Mandinga	51	4.90
'Mandinga	50	4.90
*Mandinga	46	6.22
*Mandinga	46	6.32
'Mandinga	28	5.64
'*Mandinga	27	5.64
*Mandinga	27	6.09
Nortes	130	6.25
Secas	49	4.36

***Misma mM / Diferente pI. ' Mismo pI / Diferente mM.**

Las proteínas expresadas diferencialmente fueron en su mayoría las de baja mM con un intervalo de 32 a 26 kDa. Las proteínas diferenciales de las muestras de Alvarado, Nortes y Secas no presentan isoformas en mM o pI. Sin embargo, se observaron proteínas con isoformas de mM(*) de las muestras Control-: 98 kDa; Control+: 82; 30 y 28 kDa y Mandinga: 46 y 27 kDa y proteínas con isoformas de pI (') de las muestras Control+: 5.03 y 5.12; Mandinga: 5.64.

Spots 1 a 5.

En los geles 2DE de branquia de ostiones de todas las muestras se expresaron de manera persistente 5 spots que fueron analizados por medio de su Intensidad Relativa (IR); Masa Molecular (mM) y Punto Isoeléctrico (pI) calculados.

Intensidad Relativa.

La IR de los spots presentó diferencias en los mínimos y máximos: spots 1: 4×10^{-4} a 9×10^{-4} ; spot 2: 3×10^{-4} a 9×10^{-4} ; spot 3: 3×10^{-4} a 13×10^{-4} ; spot 4: 6×10^{-4} a 18×10^{-4} ; spot 5: 4×10^{-4} a 22×10^{-4} , respectivamente. **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** De acuerdo con las Pruebas de las Medianas y Kruskal-Wallis la IR de los todos los spots es estadísticamente similar. Los cálculos se realizaron con un nivel de confianza de 95% ($p=0.05$).

Masa Molecular.

La mM mínima y máxima de los spots fue muy similar entre las muestras: spot 1: 76/66; spot 2: 69/60; spot 3: 63/53; spot 4: 55/ 49 y spot 5: 38/33 kDa (Figura 24).

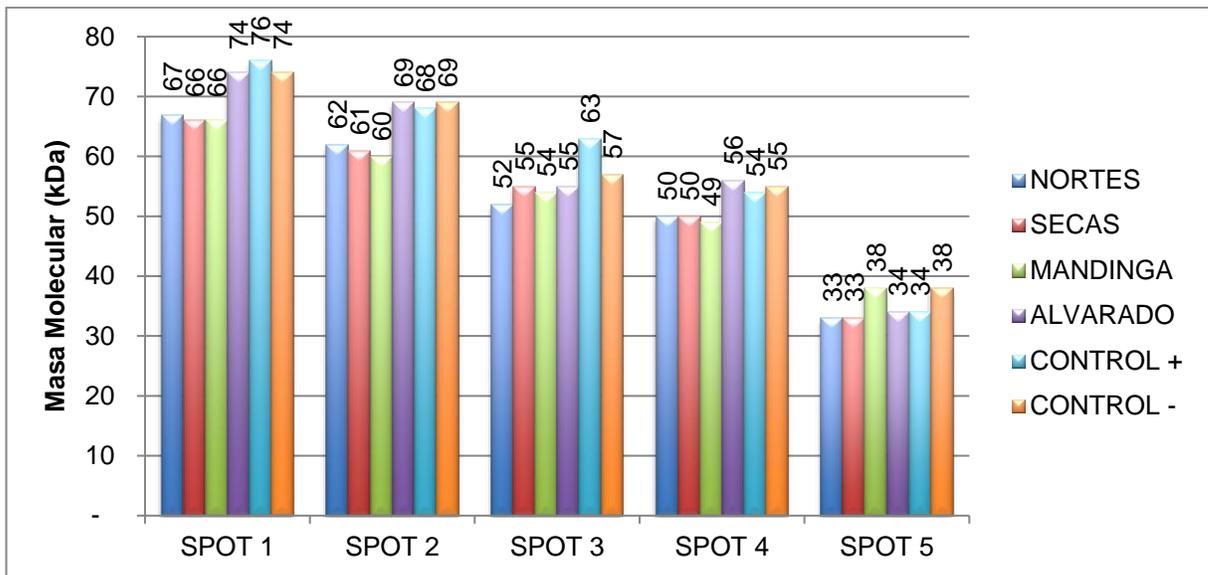


Figura 24. Masa molecular de los spots 1 a 5 de branquia de ostión de las Lagunas Tampamachoco (Nortes, Secas); Mandinga (lluvias); Alvarado (lluvias); Controles (Positivo y Negativo).

La mM también se analizó con las Prueba de las Medianas y Kruskal-Wallis con las que se determinó que la mM de los spots es estadísticamente similar entre las muestras con un nivel de confianza de 95% ($p=0.05$).

Punto Isoeléctrico.

El pi calculado en los spots 1-5 mostró intervalo de 4.42 a 5.68 unidades de pH con un máximo de 5.01; 4.90; 5.04; 5.75 y 5.65 y un mínimo de 4.53; 4.49; 4.39; 5.10 y 4.70 con una diferencia de 0.48; 0.41; 0.65; 0.65 y 0.95, respectivamente (Figura 25).

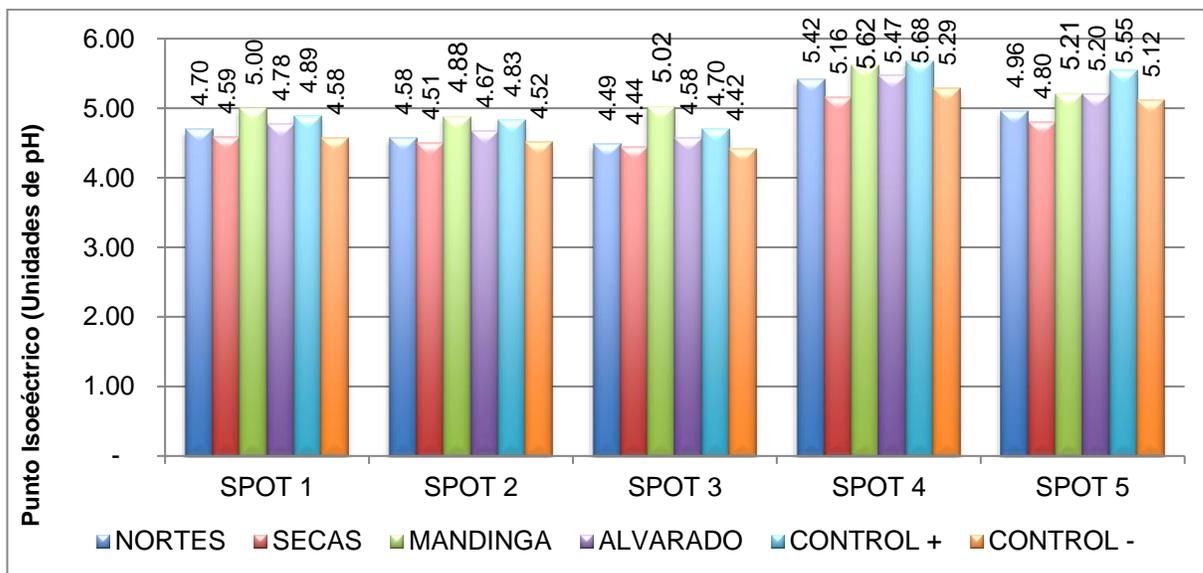


Figura 25. Representación gráfica del Punto Isoeléctrico (Unidades de Intensidad Relativa) calculado a partir del gel 2DE de muestras de branquia de las Lagunas Tampamachoco (Nortes, Secas), Mandinga (Iluvias), Alvarado (Iluvias) y Controles Positivo y Negativo.

Como se observa en la gráfica anterior la diferencia en el pI de las muestras analizadas no presenta una diferencia significativa, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis para concluir con una $p=0.05$ que no existen diferencias significativas entre los pI de las muestras.

Tabla 13. Comparativo de mM, pI e IR de los Spots del 1 al 5 de muestras de branquia de ostión de la Laguna Tampamachoco (Secas y Nortes) Laguna Mandinga, Laguna Alvarado, Control Positivo y Control Negativo.

	NORTES	SECAS	MANDINGA	ALVARADO	CONTROL +	CONTROL -
mM	67.27	66.21	66.10	74.40	76.03	74.24
SPOT 1 pI	4.70	4.59	5.00	4.78	4.89	4.58
IR($\times 10^{-4}$)	6.20	6.00	5.80	3.50	7.70	8.50
mM	62.37	61.48	60.10	69.36	68.18	68.57
SPOT 2 pI	4.58	4.51	4.88	4.67	4.83	4.52
IR($\times 10^{-4}$)	7.50	6.50	6.00	2.80	7.50	8.70
mM	52.28	54.65	53.58	55.48	62.82	57.03
SPOT 3 pI	4.49	4.44	5.02	4.58	4.70	4.42
IR($\times 10^{-4}$)	8.40	3.20	7.30	4.40	12.70	9.70

	mM	50.49	49.50	49.36	56.28	54.09	54.75
SPOT 4	pI	5.42	5.16	5.62	5.47	5.68	5.29
	IR(x10 ⁻⁴)	17.60	14.90	15.20	61.00	13.30	18.30
	mM	32.75	32.50	38.07	33.61	33.91	37.58
SPOT 5	pI	4.96	4.80	5.21	5.20	5.55	5.12
	IR	7.10	7.20	6.40	3.50	15.10	22.10

SPOTS 5.1 A 5.4.

En las muestras de Nortes, Secas y Mandinga se expresaron los spots 5.1; 5.2 y 5.3, mientras que en la muestra de Alvarado solo se expresaron los dos primeros y en los controles no se expresó ninguna de éstas.

Intensidad Relativa.

La IR del spot 5.1; 5.2 y 5.3 de Mandinga fue mas elevada que la de las muestras de Nortes, Secas y Alvarado.

Masa Molecular.

La mM de los spots 5.1; 5.2 y 5.3 de las muestras de Nortes, Secas, Mandinga y Alvarado es similar en todos los casos con un mínimo de 32 y un máximo de 38 kDa.

Punto Isoeléctrico.

Al observar los valores mínimo y máximo de los pI de los spots 5.1, 5.2 y 5.3 se determinó que existe una diferencia de 0.29, 0.27 y 0.27 unidades de pH, respectivamente.

Tabla 14. Comparativo de mM, pI e IR de los Spots del 5.1 al 5.3 de muestras de branquia de ostión de la Laguna Tampamachoco (Secas y Nortes) Laguna Mandinga y Laguna Alvarado.

SPOT	NORTES			SECAS			MANDINGA			ALVARADO		
	IR (10 ⁻³)	mM	pI									
5.1	7	33	5.14	6	33	5.02	10	38	5.31	4	34	5.27
5.2	8	33	5.28	6	33	5.14	13	38	5.41	9	34	5.41
5.3	8	33	5.42	18	32	5.27	25	38	5.54	--	--	--

SPOTS independientes.

Adicionalmente se expresaron de manera independiente los siguientes spots:

Tabla 15. Spots expresados independientemente en las muestras de Alvarado, Secas y Control Negativo.

SPOT	Muestra	IR	mM	pI
2.1	Alvarado	29 x10 ⁻³	68	4.67
3.1	Secas	27 x10 ⁻³	52	4.46
3.2	Secas	35x10 ⁻³	46	4.46
3.1	Control Negativo	94x10 ⁻³	55	4.54

El spot 2.1 únicamente se presenta en la muestra de Alvarado, por su mM y pI se propone que sea una isoforma de la proteína 2 y que su expresión sea debida a algún estresor particular de la laguna.

Discusión Electroforesis Bidimensional.

Recientemente la proteómica ambiental se aplica en organismos marinos de laboratorio y campo (Chen y Huang, 2011); Chora (2009) señala que las modificaciones en el proteoma de los moluscos son cada vez más utilizados para evaluar los efectos de la contaminación del agua, en el presente trabajo se llevaron a cabo análisis 2DE de tejidos de branquia de ostión debido a que sirven simultáneamente como estructuras de alimentación atrapando al plancton vía mucus producido por las células de la branquia y movidos hacia la boca por estas mismas células, además de que funcionan como un órgano facilitador del consumo de oxígeno por su amplia superficie que favorece el intercambio de gases (Tomanek, 2012).

Melwani (2016) asevera que actualmente se ha incrementado el uso de la 2DE en evaluaciones de organismos sometidos a un contaminante particular; sin embargo, aún no se conoce la expresión de dichos organismos en condiciones naturales, en el presente estudio se analizaron ostiones en condiciones naturales de las laguna Tampamachoco, Alvarado y Mandinga así como ostiones en condiciones controladas (Control Negativo) y posteriormente sometidos a estrés térmico (Control Positivo), encontrando expresión diferencial en los perfiles proteicos.

En este estudio se consideraron los spots con mayor definición, en un análisis similar Cao (2009) asevera que el número de spots detectados fue menor a lo que esperaba con relación a la capacidad de resolución de la técnica, debido al

enfoque conservativo utilizado en el análisis de los geles tomando en cuenta únicamente con los spots claros y bien definidos, mientras que las áreas confusas no se consideraron de las 312 proteínas analizadas en el total de los geles, las proteínas expresadas se encuentra en los intervalos de mM de 40-59 kDa (86); 60-79 kDa (73); 20-39 kDa (59); 80-99 kDa (54); 100-151 kDa (40).

Los perfiles de expresión de proteínas fueron diferentes entre las muestras, con mayor cantidad de expresión de proteínas en las muestras de Alvarado (104), Control+ (85) y Mandinga (75) y de menor expresión en las muestras de Secas (26); Nortes (23) y Control- (23); sin embargo, en todas las muestras prevalecieron las proteínas cercanas a los 44 kDa; y un grupo de proteínas denominadas spots 1 a 5. Tomanek (2012) sugiere que los cambios importantes en la abundancia de las proteínas pueden suceder por tres razones: síntesis, modificaciones post-traduccionales y degradación. Cao (2009) evaluó los perfiles proteicos de *Crassostrea gigas* y *Ostrea edulis* expuestos al parásito *Bonamia ostreae* determinando una mayor cantidad en la expresión de proteínas en *C. gigas* debido a su resistencia al parásito mientras que *O. edulis* fue mas susceptible y su expresión fue menor.

Alvarado y Mandinga son lagunas del sur de Veracruz que presentan contaminación por diversos factores como hidrocarburos, plásticos, descargas domésticas, turísticas e industriales, tala inmoderada, ganadería, etcétera, esta situación no es particular de estas lagunas; por lo que se sugiere que la expresión de las proteínas de estos sitios puede ser debida a la presencia de contaminantes.

Por otra parte en la Laguna Tampamachoco de acuerdo con los análisis realizados por Botello (2010), la contaminación es mayormente debida a la presencia de bacterias patógenas para el ser humano y los contaminantes químicos están por debajo de los niveles que dañan al bentos (Long *et al.*, 1995), por tanto se propone que la diferencia de expresión de las proteínas entre las muestras de Nortes y Secas es debida a que los ostiones de esta localidad están expuestos a factores físico-químicos como temperatura, oxígeno disuelto y pH y que las diferencias en el control positivo fue generada por el estrés térmico.

Melwani (2016) analizó ostiones cercanos al Puerto de Sidney, Australia sugiriendo que la respuesta proteómica relacionada con los impactos ambientales fue en dos categorías subcelulares: metabolismo energético y citoesqueleto; Mendelsohn (2009) analizó al pez cebrá exponiéndolo a anoxia y de acuerdo con sus resultados asevera que la mayoría de los cambios proteínicos observados en la anoxia aguda fueron de baja magnitud, asumiendo que las respuestas suceden lentamente o no requieren de un gran cambio a nivel proteína o regulación.

Además de las proteínas mencionadas con anterioridad, se encuentran las proteínas expresadas en el Cuadrante IV con intervalos de mM de 44.93 y 39.88 kDa y pH de 6.94 a 6.07 pl en las que se observaron las siguientes isoformas: Alvarado (6); C- (2); C+ (6); Mandinga (4); Nortes (4); y Secas (1); y las de intervalos de 60.22 a 49.71 kDa y pH de 6.30 a 5.80 pl, con las siguientes isoformas: Alvarado (2); C- (2); C+ (3); Mandinga (3); Nortes (1); y Secas (1).

Chora (2009) identificó las proteínas citoesqueléticas tubulina (55 kDa) y actina 43 (kDa) en la almeja *Ruditapes decussatus* expuesta a cadmio notando una sobreexpresión de actina en branquia, señalando que la mayoría de las actinas tienen una mM de 43kDa, por lo que propone que los diferentes spots identificados en su trabajo podrían ser alfa (α); beta (β) o gama (γ) actina, en este análisis las proteínas en el Cuadrante IV podrían ser isoformas de las proteínas actina y tubulina.

Además de sus tres isoformas, la actina puede presentar modificaciones post-traduccionales como lo sugiere McDonagh (2006) al haberla identificado carbonilada, ubiquitinada y glutationilada expresada en branquias, manto y glándula digestiva del mejillón *Mytilus edulis* control y tratados con pro-oxidantes como el H_2O_2 , $CdCl_2$ y la Menadiona que proporcionaron respuestas significativas en los niveles de carbonilación.

Estadísticamente los spots 1 a 5 no presentan diferencias significativas por lo que inferimos que se trata de proteínas constitutivas que se expresan de manera continua en todas las células.

Melwani (2016) observó mayor cantidad en la expresión de las proteínas HSPs en el intervalo de 60-79 y argumenta que su papel en el mantenimiento de la homeostasis proteica ha sido bien documentado particularmente cuando existen cambios involucrados en la actina del citoesqueleto. En este análisis, los spots 1 y 2 en todas las muestras estuvieron dentro de los intervalos de mM: 76-66 kDa y

60-69 kDa; de pI 4.59-5.00 y 4.51-4.88 y 5.00, por lo que se propone como HSPs dedicadas al mantenimiento de la homeostasis proteica, particularmente el spot 2.1 de la muestra de Alvarado que presentó una mM de 68 kDa y un pI de 4.67 ya que solo se expresó en esa muestra.

La tubulina es una familia de proteínas de mM de 55 kDa con isoformas alfa (α) beta (β); gama (γ); delta (δ); épsilon (ϵ) y zeta (ζ) que presentan una identidad del 35 al 40% en sus cadenas de aminoácidos y su similitud con otras proteínas es mínima. Los spots 3 y 4 en todas las muestras estuvieron en un intervalo de mM de 62.82-52.28 y 56.28-49.36 kDa; pI de 4.42-5.02 y 5.16-5.68, por lo que se propone puedan pertenecer al grupo de las tubulinas (Chora *et al.*, 2009) con sus respectivas isoformas, como sucedió con el spot 3.1 de las muestras de Secas y Control Negativo y el spot 3.2 de la muestra de secas con mM de 52, 55 y 46 kDa y pI de 4.46, 4.54 y 4.46 respectivamente.

Las proteínas del spot 5 se encuentran en el intervalo de mM de 38.07-32.5 kDa y pI de 4.80-5.55; Tomanek (2012) trabajó con los mejillones *Mytilus galloprovincialis* (ambiente templado) y *Mytilus trossulus* (ambiente frío), sometidos a especies reactivas al oxígeno, estableció que la mayor expresión de las pequeñas HSPs indican un rol crucial en la tolerancia al estrés ambiental, posiblemente debido a su importancia en la estabilización de elementos citoesqueléticos y su función protectora ante el estrés oxidante.

La expresión del Spot 5 en las muestras Control+ y Control- fue de tres a cuatro veces más elevada que en el resto de las muestras, esto puede ser debido a que permanecieron en condiciones controladas óptimas para su sobrevivencia y el resto de las muestras se encontraron expuestas a estresores ambientales que pudieron inhibir la expresión de esta proteína, como es el caso de la muestra de Alvarado que presentó la menor intensidad en todos los spots, los cambios en el estrés térmico o ROS inducidos en el citoesqueleto parecen enfrentar la homeostasis proteica, induciendo pequeñas HSPs que son capaces de estabilizar el citoesqueleto bajo ambas condiciones (Tomanek, 2012).

Los spots 5.1; 5.2 y 5.3 se expresaron en las muestras de Nortes, Secas, Mandinga y Alvarado no se expresaron en las muestras Control que estuvieron en condiciones óptimas para su desarrollo a pesar de que el Control Positivo fue expuesto a estrés térmico; por lo que se proponen como modificaciones pos-traduccionales del spot 5 debidas a un estresor diferente al térmico.

Las proteínas diferencialmente expresadas entre las muestras fueron en su mayoría las de baja mM con un intervalo de 32 a 26 kDa. Las proteínas diferenciales de las muestras de Alvarado, Nortes y Secas no presentan isoformas en mM o pI. Sin embargo, se observaron proteínas con isoformas de mM de las muestras Control-: 98 kDa; Control+: 82; 30 y 28 kDa y Mandinga: 46 y 27 kDa y proteínas con isoformas de pI de las muestras Control+: 5.03 y 5.12; Mandinga: 5.64. Tomanek (2012) apunta que un número de chaperonas moleculares cambiaron su abundancia entre las cuales están las HSP90, chaperoninas y

ciclofilinas; pero las Hsp70 y las pequeñas HSPs fueron las más abundantes y diversas.

Melwani (2016) encontró que las proteínas asociadas con respuesta al estrés celular particularmente las chaperonas moleculares (HSPs) y el estrés oxidante (glutación S-transferasa) fueron las proteínas diferenciales expresadas mayormente debido a la necesidad de proteger a las células del exceso de ROS lo puede ser un indicador de disrupción del citoesqueleto, por tanto los cambios en proteómica reflejan una respuesta adaptativa al exceso de producción de ROS a través de la activación de respuestas intracelulares al estrés y modificación de la producción de proteínas del citoesqueleto.

Wei (2015) identificó en el ostión *C. gigas* una serie de proteínas expresadas como consecuencia de la exposición a pCO_2 que tienen similitud con algunas proteínas expresadas en las muestras analizadas en este trabajo:

Tabla 16. Proteínas que pueden ser semejantes entre *C. gigas* y *C. virginica*.

NOMBRE DE LA PROTEÍNA (Wei <i>et al.</i> , 2015)	pl	mM	Muestra	pl	mM
Stress response protein nhaX	5.73	18.42			
Hypothetical protein	5.96	69.48	C-^	5.88	70.59
Cavortin	4.82	19.56			
Ectoine hydroxylase	6.07	84.36			
Prot. N-terminal asparagine amidohydrolase	6.56	28.46	Mandinga	6.16	28.96
Arginina cinasa	6.58	40.01	Nortes^	6.36	40.70
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	4.85	54.14	Secas	4.93	55.50
Hypothetical protein	5.65	24.70	Secas^	5.53	24.03
Hypothetical protein*	5.65	24.70	Nortes	5.58	23.71
Acyl-protein thioesterase 2	6.19	23.95			
Troponin T, skeletal muscle	5.02	20.71			

Las muestras con mayores diferencias fueron Alvarado, Control Positivo y Mandinga, al igual que Melwani (2016) se infiere que estos conjuntos de proteínas diferenciales contribuyen a revelar vías funcionales que fueron afectadas en los sitios altamente impactados sugiriendo una respuesta subcelular.

Subsecuentemente el análisis de 2DE provee fuerte evidencia de que los proteomas de los ostiones fueron significativamente alterados en los sitios altamente impactados. Sin embargo, muchos estudios solamente comparan dos tratamientos en un tiempo específico, lo cual limita la habilidad de entender las respuestas agudas y crónicas a las condiciones estresantes (Melwani *et al.*, 2016)

Por lo que estudios en los que se apliquen tratamientos con estresores individuales y múltiples simultáneamente son necesarios para evaluar la tolerancia y la sinergia entre los estresores (Tomanek, 2014)

DISCUSIÓN GENERAL.

Los sistemas estuarinos-lagunares son los ambientes mas dinámicos en el océano, debido a las amplias fluctuaciones en los niveles de las mareas; los cambios diarios y estacionales en el pH, el oxígeno disuelto, la salinidad y la temperatura; así como los fenómenos meteorológicos, son entre otros factores los que proporcionan este dinamismo. Los organismos residentes en las lagunas costeras están expuestos a las fluctuaciones del medio lo que consecuentemente ha llevado a la adaptación de las comunidades. En las poblaciones las interacciones biológicas son importantes en la determinación de la abundancia de

individuos; sin embargo, los factores abióticos o físico-químicos son la principal razón de los cambios en las poblaciones.

Entre otros organismos residentes en las lagunas costeras se encuentran los moluscos bivalvos que destacan por su papel fundamental en el ecosistema marino y por su valor comercial en la industria de la acuicultura, de ahí la importancia de evaluar su estado de salud a través de las respuestas fisiológicas a los estresores ambientales. A diferencia de otros organismos bivalvos, los ostiones están adheridos permanentemente a superficies rocosas por lo que no se pueden escapar de ningún estrés biótico o abiótico que afecte la zona y los hace eficientes organismos indicadores (bioindicadores) de lagunas costeras.

Si bien, Botello *et al.* (2016) demostraron que la contaminación de la Laguna Tampamachoco ha ido en decremento en relación con contaminantes generados antropogénicamente, existen otros factores como el cambio climático que provoca variaciones en los componentes físico-químicos del océano como pH, hipoxia, salinidad y temperatura (Tomanek, 2012). En este estudio se encontraron diferencias entre los parámetros físico-químicos de la Laguna Tampamachoco durante las épocas de recolecta, principalmente el pH.

Wei (2015) explica que debido a actividades humanas como combustión de fósiles y deforestación la concentración del CO₂ en la atmósfera aumentó de 280 ppm a 384 ppm en 2007 y actualmente presenta un incremento de 0.5 %; 100 veces más rápido que cualquier cambio durante los últimos 650,000 años. La superficie del

océano absorbe alrededor del 25 % del CO₂ liberado en la atmósfera lo que resulta en cambios en la química del sistema marino de carbonatos y reducción del pH; el ión carbonato disminuye y el ion bicarbonato incrementa provocando una disrupción en los principales procesos ecológicos y biogeoquímicos del sistema.

El océano abierto se caracteriza por sus valores constantes de pH, mientras que los estuarios y lagunas costeras muestran variaciones que sugieren que los organismos de estos ambientes actualmente están experimentando fluctuaciones más grandes que las predichas como Tomanek (2014) quien propone que para el año 2100 el pH del océano tendrá una disminución de 0.4 unidades; sin embargo, en este estudio se reportó que La Laguna Tampamachoco presentó una disminución de 0.7 unidades de pH entre 2013 y 2016, lo que representa un 8.12 % de incremento en la acidificación del sistema, disminución que puede tener consecuencias fisiológicas individuales y extrapolarse a niveles poblacional y del ecosistema.

Timmins-Schiffman (2014) señalan que aunque algunas especies muestran un grado de adaptación a la variabilidad del pH, los invertebrados sésiles son particularmente sensibles a la acidificación a través de sus estadios de vida; por ejemplo, los bivalvos sufren retrasos en el desarrollo larval y reducción durante la deposición de sus conchas lo que provoca reducción en su integridad debida a malformaciones, el éxito reproductivo es disminuido, la calcificación de sus conchas disminuye linealmente con la disminución del pH; además de los

impactos fenotípicos, la acidificación puede resultar en significativos inconvenientes en el metabolismo y utilización de recursos energéticos de los invertebrados; en este estudio se pudo observar la ruptura y desintegración de las conchas de los ostiones al ser desconchados que posiblemente fue generada por la disminución del pH.

De acuerdo con Grazeau (2007), la tasas de calcificación de *Maytilus edulis* y *Crassostrea gigas* disminuyen fuertemente en función de la disminución del pH, incremento del CO₂ y disminución del CO₃²⁻, disponibles en el medio; otro factor importante en el desarrollo de los organismos acuáticos es la concentración de oxígeno disuelto, en este estudio.

De acuerdo con Patterson (2014), el límite para llegar a la hipoxia es de 2 mg/L de O₂D, concentración en la que se presentan significativos impactos en el ecosistema en términos de diversidad y abundancia de especies; 4 mg/L de concentración de O₂D representan el mínimo para que un ecosistema se mantenga saludable; a bajas concentraciones de O₂D los organismos son afectados subletalmente reduciendo su crecimiento, su alimentación e incrementando su susceptibilidad a las enfermedades; sin embargo, la tolerancia que tienen los ostiones no está muy bien comprendida, pues estos cambios de concentración en O₂D se presentan naturalmente en el medio.

En este estudio se reportaron 10.15±2.56 mg/L en la época de Secas (2013) y 6.21±0.68 y 5.04±1.33 mg/L en la época de Nortes (2014 y 2016), de acuerdo con

la CCME (2003) se espera que cuanto mas baja sea la temperatura del agua mayor cantidad de oxígeno disuelto se encuentre en el sistema; aunque estos resultados son inversos. Betanzos-Vega (2016) reporta que los intervalos de 4.18 a 6.92 mg/L en O₂D y 24.46 a 29.72 °C de Temperatura, fueron óptimos para el desarrollo de *C. virginica* como una especie comercializable en Cuba, en este estudio se observó que aunque las concentraciones de oxígeno en la época de Nortes fueron bajas los organismos se reprodujeron y alcanzaron tamaños comerciales.

Shumway (1996) y (Team, 2007) señalan que la temperatura y la salinidad son factores abióticos que en conjunto afectan aspectos de la biología de los ostiones como alimentación, respiración, utilización de reservas alimenticias, desarrollo gonadal, tiempo de desove, interacciones durante enfermedades parasitarias; las tasas de predación, crecimiento, distribución y mortalidad de los ostiones debidas a cambios en la salinidad son dependientes de la temperatura, particularmente la tasa de crecimiento presenta una variación estacional a determinadas latitudes con máximos de crecimiento durante el verano y el otoño, en este estudio la salinidad permaneció sin cambios significativos entre las épocas de recolecta.

Las temperaturas registradas entre las épocas de Secas y Nortes se encuentran dentro de los intervalos óptimos para el desarrollo de los ostiones (UNEP, 2008); sin embargo, en la época de Secas la temperatura fue mas elevada en alrededor de 7 °C con relación a la época de Nortes; Abbe (2000) reporta que el aumento de temperatura provoca un incremento de la acumulación de Cd y Cu en tejido de

ostiones, debido a la temperatura las tasas metabólicas incrementan su actividad por lo podría ser un factor abiótico que genera cambios en las respuestas de los ostiones al medio.

En respuesta a los factores ambientales, las células reaccionan encendiendo mecanismos de defensa que incluyen la detoxificación de xenobióticos, la regulación de estrés oxidante, el plegamiento de proteínas desnaturalizadas, la activación de la maquinaria de reparación del DNA, y la síntesis de nuevas proteínas (Farcy *et al.*, 2009).

Ait-Aissa (2000) menciona que los genes de las *Hsp* son activados por un gran número de estresores físicos, químicos o biológicos; por tanto, es importante conocer el estado del ecosistema en el momento de recolectar organismos silvestres para analizarlos, en este estudio al parecer no fueron los contaminantes los que provocaron la expresión de los genes *Hsp*; sin embargo, esta expresión pudo haber sido generada por los cambios físico-químicos que sufren los ostiones en su vida cotidiana, no siendo una condición de adaptación pues al comparar los ostiones extraídos de la Laguna, los adquiridos en la Cooperativa y los sometidos a condiciones óptimas controladas, los primeros dos presentan una expresión de los genes *Hsp* mucho más elevada.

Huvet (2004) señala que la técnica de RT-PCR permite la identificación de genes que se expresan diferencialmente en respuesta a un estímulo; sin embargo, existen pocos reportes de genes involucrados en respuesta al estrés en ostiones.

An (2010), reportan que la almeja *Scapharca broughtonii* responde al estrés térmico induciendo estrés oxidante incrementando la expresión del mRNA y la actividad de SOD y CAT; deducen que en etapas tempranas de exposición las enzimas regulan el estrés oxidante; sin embargo, el estrés oxidante causado por exposición prolongada reduce la expresión tanto del mRNA como de la actividad de las enzimas antioxidantes, resultando en un incremento de la concentración de H₂O₂ y niveles de lipoperoxidación, en este estudio no se evaluaron las enzimas antioxidantes, sin embargo los genes de HSP se expresaron diferencialmente con relación a las condiciones ambientales en el momento de recolecta.

En este estudio se analizaron los genes de *Hsp* de ostiones extraídos de la Laguna Tampamachoco y adquiridos en la Cooperativa del sitio con una expresión de 87.55 y 12.99 veces más, respectivamente, que los sometidos a condiciones óptimas, lo que nos llevó a analizarlos en otros niveles de expresión.

A nivel proteína, la PAGE es una herramienta que de manera sencilla permite ubicar proteínas de interés y/o diferencias entre las muestras lo que a su vez se puede traducir en un análisis puntual mediante otras técnicas, en este trabajo se analizaron las diferencias entre estaciones climáticas de Secas y Nortes, además de Branquia, Manto y Glándula Digestiva de ostiones de la Laguna de Tampamachoco entre todas estas muestras se encontraron diferencias; sin embargo, no existen reportes previos de esta técnica aplicada en ostiones, para tener un mejor conocimiento sobre el nivel de estrés se procedió a realizar un

análisis de inmunodetección o Western Blot con proteínas de estrés térmico (HSP).

En este estudio se detectaron tres isoformas de HSP identificadas como HSP73, HSP72 y HSP69; la expresión de las isoformas de la familia de las HSP parece ser específica y dependiente, de la especie y el estresor, por ejemplo Chapple (1997) reportaron la expresión de las isoformas HSP-78, HSP-72 y HSP-70 en *Mytilus edulis*; Snyder (2001) evaluaron las HSP en *Mytilus galloprovincialis* y *Haliotis rufescens* y reportaron las isoformas HSP-74, HSP-70 y HSP-67 en ambas especies expuestas a estrés térmico y xenobióticos; Cruz-Rodríguez (2002) y Chu (2002) reportaron la expresión de HSP-71 y HSP-69 como isoformas inducidas en *C. virginica* expuestos a hidrocarburos aromáticos policíclicos; Hamdoun (2003) y Piano (2004) encontraron las isoformas HSP-77 y 72 como constitutivas y la HSP-69 como una isoforma inducida por estrés térmico en *Crassostrea gigas* y *Ostrea edulis*, respectivamente. En este estudio la expresión de la HSP-69 en muestras de la estación de secas parece haber sido inducida.

Contrariamente, Boutet (2003b) encontró en *C. gigas* una relación inversa entre los contaminantes (principalmente metales) y la expresión de las HSP-70; Piano (2004) reportaron que después del estrés térmico, las isoformas inducidas no se expresaron en *Mytilus galloprovincialis*, *Tapes phillippinaurum* y *Scapharca inaequalvis*; sin embargo, las isoformas constitutivas se expresaron significativamente. En nuestros resultados la isoforma HSP-73 parece no haber sido reportada con anterioridad en bivalvos bioindicadores. En un análisis posterior

se utilizó la técnica de electroforesis bidimensional en la que también se obtuvieron diferencias entre las muestras.

De acuerdo con Tomanek (2014) el proteoma es una red dinámica y compleja que puede responder rápidamente a cambios ambientales a través de la multifuncionalidad de muchas proteínas, de modificaciones pos-traduccionales, e interacciones proteína-proteína.

En este trabajo se analizaron 312 proteínas que se encuentran en los intervalos de mM de 40-59 kDa (86); 60-79 kDa (73); 20-39 kDa (59); 80-99 kDa (54); 100-151 kDa (40) y de pI de 4 a 7 unidades de pH. Las muestras con mayor expresión de proteínas fueron las de Alvarado (104), Control+ (85) y Mandinga (75), mientras que las de Secas (26); Nortes (23) y Control- (23) presentaron menor expresión; asimismo, todas las muestras presentaron un grupo de proteínas con mayor intensidad que se denominaron spots del 1 al 5, debido a que tanto su mM como su pI resultaron similares, se proponen como proteínas constitutivas.

Melwani (2016) propone que el análisis de 2DE provee fuerte evidencia de que los proteomas de los ostiones son significativamente alterados en sitios altamente impactados, las muestras de Alvarado, Control+ y Mandinga obtuvieron la mayor cantidad de coincidencias entre las proteínas expresadas, por lo que se puede proponer que esta expresión es debida a las condiciones de las lagunas de Alvarado y Mandinga y al estrés térmico a que fueron sometidas las muestras del

Control+; contrastando con la expresión de las muestras de Secas, Nortes y Control- en las que su expresión fue al menos un tercio menor.

En las muestras analizadas se observa una importante cantidad de proteínas de bajo peso molecular que pueden ser del tipo de las HSP de bajo peso molecular Tomanek (2012) indica que estas proteínas tienen un papel crucial en la tolerancia al estrés ambiental, posiblemente por su importancia en la estabilización de elementos del citoesqueleto y su función protectora durante el estrés oxidante.

CONCLUSIONES.

Es esencial caracterizar el estado físico-químico de los sitios de muestreo y comparar las variaciones naturales de los biomarcadores para diferenciar el estrés inducido por contaminación del inducido por factores ambientales. El sistema estuarino-lagunar Tuxpam-Tampamachoco está presentando una acidificación superior a lo esperado por los expertos en Cambio Climático con una reducción de 0.7 unidades de pH entre 2013 y 2016.

La identificación de proteínas, a través del perfil proteico, provee información del potencial de los contaminantes a nivel bioquímico y molecular y sus efectos a nivel organismo, población y, posteriormente, a nivel ecosistema. Con base en nuestros resultados se puede proponer que los ostiones de la Laguna de Tampamachoco no presentan un estrés severo debido a contaminantes; sin embargo, sí están siendo afectados por la acidificación del sitio.

La proteómica es una herramienta prometedora bajo la perspectiva de evaluar cómo cambian las proteínas y, por tanto, cómo se adaptan los organismos a las condiciones abióticas y bióticas que caracterizan el ambiente marino; sin embargo, es necesario llevar a cabo estudios en los que se apliquen tratamientos con estresores individuales, agrupados, en ausencia de estresores y organismos controlados sin estrés para evaluar la tolerancia y la sinergia entre los estresores así como la expresión basal de los marcadores de estrés.

El presente análisis fue novedoso en el sentido que, además de utilizar muestras de dos épocas características del sitio de estudio, se analizaron muestras de organismos sometidos a condiciones controladas y a estrés térmico, además de muestras de otros dos sitios de los que se sabe están muy contaminados, lo que precisó que los organismos responden, en un momento dado, de la misma forma independientemente del estresor, al menos con respecto a la proteína Hsp70.

Un aumento en los niveles de biomarcadores puede considerarse un indicador temprano de condiciones de estrés en los organismos; sin embargo, al utilizar marcadores proteicos y moleculares de estrés se enfrenta el desafío de determinar el intervalo natural de expresión en los organismos silvestres, por lo que la medición de biomarcadores debería ser llevada a cabo rutinaria y consistentemente para permitir una comparación más significativa.

Las evaluaciones proteicas prometen mejorar nuestro entendimiento a los mecanismos bioquímicos que afectan la fisiología de un organismo bajo

condiciones de estrés, el desafío de utilizar proteínas como biomarcadores es determinar el intervalo de la expresión basal y el momento al cual se están expresando debido a un efecto adverso o a una respuesta compensatoria que protege al organismo contra daño ambiental o xenobióticos

PERSPECTIVAS.

El objetivo mayor de la ecología es caracterizar el proceso que determina la distribución y abundancia de los organismos; al evaluar los procesos biológicos simultáneamente a través de técnicas como transcriptómica, proteómica y metabolómica para determinar el efecto de los estresores ambientales en la fisiología de los organismos marinos podría constituir una herramienta poderosa para señalar las interacciones entre las condiciones ambientales, los efectos dañinos y las respuestas en los bivalvos marinos.

Las condiciones ambientales afectan los niveles de la expresión genética, comenzando en el genoma y el estado de la cromatina (epigenómica). Los cambios a estos niveles influyen la expresión de genes y el conjunto de mRNAs expresados (transcriptoma), lo cual conlleva un efecto en la síntesis de proteínas (proteómica). La regulación de todos estos sistemas también produce modificaciones en un grupo de pequeños metabolitos producidos por el organismo (metabolómica). En general, la intrincada interconexión entre las diferentes “ómicas” requiere una integración para entender como los organismos responden a los cambios en el ambiente, particularmente en el estudio de la respuesta de los bivalvos a diferentes fuentes de estrés ambiental así como su respuesta a la acidificación de los océanos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbe, G.R., et al.**, 2000. Factors that influence the accumulation of copper and cadmium by transplanted eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in the Patuxent River, Maryland. *Mar Environ Res* 49,(377-396).
- Ait-Aissa, S., et al.**, 2000. Activation of the hsp70 promoter by environmental inorganic and organic chemicals: relationships with cytotoxicity and lipophilicity. *Toxicology* 145,(147-157).
- An, M.I., et al.**, 2010. Activity of antioxidant enzymes and physiological responses in ark shell, *Scapharca broughtonii*, exposed to thermal and osmotic stress: effects on hemolymph and biochemical parameters. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 155,(34-42).
- Andrew, M.N., et al.**, 2010. Exposure to 17alpha-ethynylestradiol causes dose and temporally dependent changes in intersex, females and vitellogenin production in the Sydney rock oyster. *Ecotoxicology* 19,(1440-1451).
- Arya, R., et al.**, 2007. Heat shock genes - integrating cell survival and death. *J Biosci* 32,(595-610).
- Barnes, T.K., et al.**, 2007. A Habitat Index Model for Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*), a tool for restoration of the Caloosahatchee Estuary, Florida. *Journal of Shellfish Research* 26,(949-959).
- Betanzos-Vega, A., et al.**, 2016. Identificación del ostión americano *Crassostrea virginica* (Mollusca:Bivalvia: Ostreidae) como recurso natural en las Antillas Mayores: Cuba. *Revista Mexicana De Biodiversidad* 87,(1342-1347).
- Bierkens, J.G.**, 2000. Applications and pitfalls of stress-proteins in biomonitoring. *Toxicology* 153,(61-72).
- Botello, A.-V.**, 2010. Diagnóstico ambiental de la Laguna de Tampamachoco y posibles efectos por la operación de la Central Termoeléctrica Presidente Adolfo López Mateos en la zona de influencia: informe técnico de proyecto. UNAM - CFE, México, D.F.
- Botello, A.V., et al.**, 2016. Laguna de Tampamachoco, Veracruz, México. Características y Diagnóstico Ambiental 2009-2012. Editorial Académica Española.

- Boutet, I., et al.**, 2003a. Organization and nucleotide sequence of the European flat oyster *Ostrea edulis* heat shock cognate 70 (hsc70) and heat shock protein 70 (hsp70) genes. *Aquat Toxicol* 65,(221-225).
- Boutet, I., et al.**, 2003b. Molecular identification and expression of heat shock cognate 70 (hsc70) and heat shock protein 70 (hsp70) genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Cell Stress Chaperones* 8,(76-85).
- Bradford, M.**, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72,(248-254).
- Byrne, M.**, 2012. Global change ecotoxicology: Identification of early life history bottlenecks in marine invertebrates, variable species responses and variable experimental approaches. *Marine Environmental Research* 76,(3-15).
- Cao, A., et al.**, 2009. A proteomic approach envisaged to analyse the bases of oyster tolerance/resistance to bonamiosis. *Aquaculture* 295,(149-156).
- CCME**, 2003. Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life. Canadian Council of Ministers of the Environment, Hull, QC, Canada.
- Chapple, J.P., et al.**, 1997. Stress-70 protein induction in *Mytilus edulis*: Tissue-specific responses to elevated temperature reflect relative vulnerability and physiological function. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 217,(225-235).
- Chen, H.B., et al.**, 2011. Proteomic analysis of methyl parathion-responsive proteins in *Sparus latus* liver. *Fish Shellfish Immunol* 30,(800-806).
- Cherkasov, A.S., et al.**, 2006. Effects of acclimation temperature and cadmium exposure on cellular energy budgets in the marine mollusk *Crassostrea virginica*: linking cellular and mitochondrial responses. *J Exp Biol* 209,(1274-1284).
- Choi, Y.K., et al.**, 2008. Cadmium affects the expression of heat shock protein 90 and metallothionein mRNA in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 147,(286-292).
- Chora, S., et al.**, 2009. Effect of cadmium in the clam *Ruditapes decussatus* assessed by proteomic analysis. *Aquatic Toxicology* 94,(300-308).
- Chu, F.-L.E., et al.**, 2002. Cellular responses and disease expression in oysters (*Crassostrea virginica*) exposed to suspended field contaminated sediments. *Marine environmental research* 53,(17-35).

- Collin, H., et al.,** 2010. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, Thunberg 1793, to pesticide exposure under experimental conditions. *J Exp Biol* 213,(4010-4017).
- CONABIO,** 2006. Procesos oceanográficos.
- Contreras-Espinosa, F.,** 1993. Ecosistemas Costeros Mexicanos, 1a. ed. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad y Universidad Autónoma Metropolitana., México, D.F.
- Cruz-Rodríguez, L.A., et al.,** 2002. Heat-shock protein (HSP70) response in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, exposed to PAHs sorbed to suspended artificial clay particles and to suspended field contaminated sediments. *Aquatic Toxicology* 60,(157 - 168).
- Eason, C., et al.,** 2002. Biomarkers in toxicology versus ecological risk assessment. *Toxicology* 181-182,(517-521).
- Farcy, E., et al.,** 2008. Molecular cloning of a new member of the p53 family from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and seasonal pattern of its transcriptional expression level. *Mar Environ Res* 66,(300-308).
- Farcy, E., et al.,** 2007. Seasonal changes in mRNA encoding for cell stress markers in the oyster *Crassostrea gigas* exposed to radioactive discharges in their natural environment. *Sci Total Environ* 374,(328-341).
- Farcy, E., et al.,** 2009. Transcriptional expression levels of cell stress marker genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to acute thermal stress. *Cell Stress Chaperones* 14,(371-380).
- Fent, K.,** 2004. Ecotoxicological effects at contaminated sites. *Toxicology* 205,(223-240).
- Franzellitti, S., et al.,** 2005. Differential HSP70 gene expression in the Mediterranean mussel exposed to various stressors. *Biochem Biophys Res Commun* 336,(1157-1163).
- Garfin, D.,** 1990. One-Dimensional Gel Electrophoresis, in: Deutscher, M.P. (Ed.), *Methods in Enzymology*. Academic Press Inc., San Diego, CA, USA, p. 894.
- Gazeau, F., et al.,** 2007. Impact of elevated CO₂ on shellfish calcification. *Geophys Res Lett* 34).
- Geffard, a., et al.,** 2007. Bioaccumulation of metals in sediment elutriates and their effects on growth, condition index, and metallothionein contents in oyster larvae. *Archives of environmental contamination and toxicology* 53,(57-65).

- Gerhardt, A., et al.**, 2004. Macroinvertebrate response to acid mine drainage: community metrics and on-line behavioural toxicity bioassay. *Environ Pollut* 130,(263-274).
- Hamdoun, A.M., et al.**, 2003. Phenotypic plasticity of HSP70 and HSP70 gene expression in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): implications for thermal limits and induction of thermal tolerance. *Biol Bull* 205,(160-169).
- Huvet, A., 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).
- Ivanina, A.V., et al.**, 2008a. Effects of cadmium on cellular protein and glutathione synthesis and expression of stress proteins in eastern oysters, *Crassostrea virginica* Gmelin. *The Journal of Experimental Biology* 211,(577-586).
- Ivanina, A.V., et al.**, 2008b. Oxidative stress and expression of chaperones in aging mollusks. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 150,(53-61).
- Jenny, M.J., et al.**, 2002. Potential indicators of stress response identified by expressed sequence tag analysis of hemocytes and embryos from the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Mar Biotechnol (NY)* 4,(81-93).
- Jia, H., et al.**, 2011. Heat shock protein 10 (Hsp10) in immune-related diseases: one coin, two sides. *Int J Biochem Mol Biol* 2,(47-57).
- Karouna-Renier, N.K., et al.**, 2007. Accumulation of organic and inorganic contaminants in shellfish collected in estuarine waters near Pensacola , Florida : Contamination profiles and risks to human consumers. *Environmental Pollution* 145,(474-488).
- Kennedy, V.S.**, 2009. *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) [Ostreidae], Cultured Aquatic Species Fact Sheets. FAO.
- Kite-Powell, H.L., et al.**, 2008. Linking the oceans to public health: current efforts and future directions. *Environ Health* 7 Suppl 2,(S6).
- Laemmli, U.K.**, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227,(680-685).
- Lambin, P., et al.**, 1976. A new method for determination of molecular weights of proteins by electrophoresis across a sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gradient gel. *Anal Biochem* 74,(567-575).

- Long, E.R., et al.**, 1995. Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. *Environmental Management* 19,(81-97).
- Macauley, J.M., et al.**, 1997. Estimating the ecological condition of the estuaries of the gulf of Mexico. *Environmental Monitoring and Assessment* 57,(59-83).
- Matthiessen, G.C.**, 2001. *Oyster Culture*. Blackwell Science Ltd, Connecticut, USA.
- McDonagh, B., et al.**, 2006. Redox proteomics in the blue mussel *Mytilus edulis*: Carbonylation is not a pre-requisite for ubiquitination in acute free radical-mediated oxidative stress. *Aquat Toxicol* 79,(325-333).
- Melwani, A.R., et al.**, 2016. Differential proteomic response of Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*) to prolonged environmental stress. *Aquat Toxicol* 173,(53-62).
- Mendelsohn, B.A., et al.**, 2009. Proteomic analysis of anoxia tolerance in the developing zebrafish embryo. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* 4,(21-31).
- Merril, C.R.**, 1990. Gel-Staining Techniques, in: Deutscher, M.P. (Ed.), *Methods in Enzymology*. Academic Press, Inc., San Diego, CA, USA, p. 894.
- Moissenko, T.I.**, 2005. Ecotoxicological Approach to Water Quality Assessment. *Water Resources* 32,(163-174).
- Ortiz-Zarragoitia, M., et al.**, 2006. Biomarkers of exposure and reproduction-related effects in mussels exposed to endocrine disruptors. *Archives of environmental contamination and toxicology* 50,(361-369).
- Patterson, H.K., et al.**, 2014. Biomarkers of Dissolved Oxygen Stress in Oysters: A Tool for Restoration and Management Efforts. *Plos One* 9).
- Peach, M., et al.**, 2015. Solubilization of Proteins: The Importance of Lysis Buffer Choice, in: Biji T. Kurien, *et al.* (Eds.), *Western Blotting Methods and Protocols*. Springer New York Heidelberg Dordrecht London, New York, p. 502.
- Piano, A., et al.**, 2002. Hsp 70 expression in thermally stressed *Ostrea edulis*, a commercially important oyster in Europe. *Cell Stress & Chaperones* 7 (3),(250-257).

- Piano, A., et al.**, 2004. Expression of cytoprotective proteins, heat shock protein 70 and metallothioneins, in tissues of *Ostrea edulis* exposed to heat and heavy metals. *Cell Stress Chaperones* 9,(134-142).
- Quilang, J., et al.**, 2007. Generation and analysis of ESTs from the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin and identification of microsatellite and SNP markers. *BMC Genomics* 8,(157).
- RAMSAR**, 2005. Ficha Informativa de los Humedales - Convention on Wetlands.).
- Ritossa, F.**, 1996. Discovery of the heat shock response. *Cell Stress Chaperones* 1,(97-98).
- Ruppert, E.E., et al.**, 1996. Zoología de los invertebrados. McGraw-Hill Interamericana México.
- Ryan, J.A., et al.**, 1996. Stress proteins as molecular biomarkers for environmental toxicology, in: U. Feoge, *et al.* (Eds.), *Stress-Inducible Cellular Responses*. Deutsche Bibliothek Cataloging, Basel, Switzerland, p. 491.
- SAGARPA**, 2006. Carta Nacional Pesquera 2ª Sección.
- Sanni, B., et al.**, 2008. Effects of acclimation temperature and cadmium exposure on mitochondrial aconitase and LON protease from a model marine ectotherm, *Crassostrea virginica*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 147,(101-112).
- Sarkar, A., et al.**, 2006. Molecular Biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology* 15,(333-340).
- Schneider, C.A., et al.**, 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods* 9(7),(671–675).
- Shi, J., et al.**, 2016. Characterization and function analysis of Hsp60 and Hsp10 under different acute stresses in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Cell Stress Chaperones* 21,(295-312).
- Shumway, S.E.**, 1996. Natural Environmental Factors, in: Kennedy, V.S., *et al.* (Eds.), *The Eastern Oyster. Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant College Meryland, U.S.A., p. 719.
- Silver, J.T., et al.**, 2012. Regulation of survival gene hsp70. *Cell Stress Chaperones* 17,(1-9).
- Singer, C., et al.**, 2005. Induction of heat shock proteins (hsp70) in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) following exposure to platinum group

metals (platinum, palladium and rhodium): comparison with lead and cadmium exposures. *Aquat Toxicol* 75,(65-75).

Snyder, M.J., et al., 2001. Induction of marine mollusc stress proteins by chemical or physical stress. *Arch Environ Contam Toxicol* 41,(22-29).

T. Reid, A., et al., 2019. Local unfolding of the HSP27 monomer regulates chaperone activity. *NATURE COMMUNICATIONS* 10:1068 |).

Team, E.O.B.R., 2007. Status review of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*), in: National Marine Fisheries Service, *et al.* (Eds.). NOAA.

Timmins-Schiffman, E., et al., 2014. Shotgun proteomics reveals physiological response to ocean acidification in *Crassostrea gigas*. *BMC Genomics* 15,(951).

Toledo, A., 2005. Marco Conceptual: Caracterización Ambiental del Golfo de México., in: A., V.-B., *et al.* (Eds.), Golfo de México. Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias. Centro EPOMEX. Universidad Autónoma de Campeche, Campeche, Campeche, México, p. 695.

Tomanek, L., 2012. Environmental proteomics of the mussel *Mytilus*: implications for tolerance to stress and change in limits of biogeographic ranges in response to climate change. *Integr Comp Biol* 52,(648-664).

Tomanek, L., 2014. Proteomics to study adaptations in marine organisms to environmental stress. *J Proteomics* 105,(92-106).

Umayaparvathi, S., et al., 2013. Purification and characterization of protease from *Bacillus cereus* SU12 isolated from oyster *Saccostrea cucullata*. *AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY*).

UNEP, 2008. Water Quality Index for Biodiversity Technical Development Document, in: Programme, G.W. (Ed.). United Nations Environment Programme, Gatineau, Canadá, p. 64.

Vasquez, H.E., et al., 2013. A glycoprotein in shells of conspecifics induces larval settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *PLoS One* 8,(e82358).

Wei, L., et al., 2015. Proteomic and metabolomic responses of Pacific oyster *Crassostrea gigas* to elevated pCO₂ exposure. *J Proteomics* 112,(83-94).

Zhang, Z., et al., 2012. Molecular cloning, characterization and expression of heat shock protein 70 gene from the oyster *Crassostrea hongkongensis*

responding to thermal stress and exposure of Cu(2+) and malachite green. Gene 497,(172-180).

Zolkiewski, M., et al., 2012. Aggregate reactivation mediated by the Hsp100 chaperones. Arch Biochem Biophys 520,(1-6).

Zurita, J.L., et al., 2005. Ecotoxicological evaluation of the antimalarial drug chloroquine. Aquat Toxicol 75,(97-107).

Potential of the HSP70 protein family as biomarker of *Crassostrea virginica* under natural conditions (Ostreoida: Ostreidae)

Ingrid Camarena-Novelo¹, Zayil Salazar-Campos², Alfonso-V. Botello³,
Susana Villanueva-Fragoso³, Irma Jiménez-Morales⁴, Reyna Fierro⁴
& Humberto González-Márquez^{2*}

1. Posgrado en Biología Experimental. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana. Av. San Rafael Atlixco N° 187, Colonia Vicentina, Iztapalapa 09340, Ciudad de México; ingridcamarena@hotmail.com
2. Laboratorio de Expresión Génica. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana. Av. San Rafael Atlixco N° 187, Colonia Vicentina, Iztapalapa 09340, Ciudad de México; zayil.salazar@gmail.com, hgm@xanum.uam.mx
3. Laboratorio de Contaminación Marina, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Exterior s/n, Coyoacán, Ciudad Universitaria 04510 Ciudad de México; suvilla11@gmail.com, gatoponcho2015@gmail.com
4. Laboratorio de Andrología. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana. Av. San Rafael Atlixco N° 187, Colonia Vicentina, Iztapalapa 09340, Ciudad de México; jimi@xanum.uam.mx, reyna@xanum.uam.mx

* Correspondence

Received 06-XII-2018. Corrected 02-V-2019. Accepted 06-V-2019.

Abstract: The HSP70 proteins are used as exposure biomarkers, and the oyster *Crassostrea virginica* is considered as a bioindicator organism in environmental assessment. According to the season, the level of expression of the HSP70 family in wild oysters has not been characterized before. The aim of this work was to analyze the expression of the HSP70 family as an exposure biomarker using *C. virginica* gills from individuals and groups of oysters from the Tampamachoco Lagoon under natural conditions. Ninety oyster samples were collected at locations from the Tampamachoco Lagoon during the dry and “north winds” seasons. One group of oysters was maintained under laboratory conditions and exposed to thermal stress. The pH, temperature, salinity, and dissolved oxygen (DO₂) were measured inside the brackish Tuxpam-Tampamachoco system. Salinity and DO₂ were outside the limits recommended for brackish systems in both seasons. The electrophoresis and immunodetection assay of HSP70 were performed using proteins from oyster gills. The HSP73, HSP72 and HSP69 isoforms were expressed in dry season tissue samples, while only the HSP73 and HSP72 isoforms were detected in north winds season tissue samples and positive control tissue samples. The HSP73 isoform has not been previously reported in *C. virginica*. To evaluate the expression of HSP70 protein family at individual and group levels from wild animals, it is also important to determine a seasonal baseline expression.

Key words: biomarker; heat shock protein; environmental assessment; *Crassostrea virginica*.

Camarena-Novelo, I., Salazar-Campos, Z., Botello, A-V., Villanueva-Fragoso, S., Jiménez-Morales, I., Fierro, R. & González-Márquez, H. (2019). Potential of the HSP70 protein family as biomarker of *Crassostrea virginica* under natural conditions (Ostreoida: Ostreidae). *Revista de Biología Tropical*, 67(3), 572-584.

Biomarkers are measurements at any biological level that provide information concerning adverse sublethal effects due to physical, chemical or biological stressors in the laboratory or in wild organisms. Biomarkers are divided into two principal types: exposure biomarkers, which are adaptive responses that prevent damage caused by a stressor; and effect biomarkers, which refer to physiological responses to a stressor from which the organism or cell can recover (Ortiz-Zarragoitia & Cajaville, 2006; Sarkar, Ray, Shrivastava, & Sarker, 2006). Protein biomarkers are important tools in environmental assessment because they reflect early interactions of any type of stressor with the cell, which, as a consequence, alters its physiology and protein expression (Fent, 2004; Farcy, Voiseux, Lebel, & Fievet, 2009).

HSPs are found in virtually all-living organisms and evolutionarily, are highly conserved proteins. The HSP70 family is divided into two groups: constitutive HSP70 proteins have a high basal level and are softly induced by stress; inducible HSP70 proteins are virtually absent under normal conditions, and their expression increases dramatically under stress. In eukaryotes, HSP70 can be found in any part of a cell: in the cytoplasm, mitochondria, and endoplasmic reticulum, as well as inside or outside of any other organelle or compartment; however, most HSPs are located in the nucleus. After any kind of shock or stress, the HSP content in the nucleus gradually decreases, while it increases in the cytoplasm, serving as a mediator in protein biosynthesis systems and ensuring the protein resistance of the protein synthesis apparatus (Ait-Aissa, Porcher, Arriago, & Lambre, 2000; Piano, Asirelli, Caselli, & Fabbri, 2002; Arya, Mallik, & Lakhotia, 2007).

Such a universal spread of HSP70 indicates that they play an important role in the cell, and both the constitutive and inducible HSP70 isoforms are involved not only in protecting cells from heat shock but also in many other cellular processes basically everywhere a partial or full protein unfolding event occurs. The increased expression of HSPs has been shown to be protective, mainly mediated by

the HSPs capacity to act as molecular chaperones, preventing inadequate protein folding and transporting denatured proteins to target organelles for renaturation, degradation, or repair. It was showed that HSPs played critical roles in modulating apoptotic cascades (Cruz-Rodríguez & Chu, 2002; Ivanina, Taylor, & Sokolova, 2009).

The HSP70 family are included on the proteome of marine invertebrates such as mussels (*Mytilus edulis*), Pacific oysters (*Crassostrea gigas*), and echinoderms (*Strongylocentrotus purpuratus*) and are involved in the renaturation, degradation and repair of damaged proteins in organisms exposed to stressors such as chemicals, heat-stress, UV radiation, pH variations, salinity stress and dissolved oxygen variations (Cruz-Rodríguez, Baucum, Soudant, Chu, & Hale, 2000; Cruz-Rodríguez & Chu, 2002; Gazeau, Quiblier, Jansen, Gattuso, Middelburg, & Heip, 2007; Geffard, Geffard, Amiard, His, & Amiard-Triquet, 2007). HSP70 family protein expression in *Crassostrea virginica* has been reported before by Cruz-Rodríguez et al. (2000) and Cruz-Rodríguez & Chu (2002), in oysters exposed to PCB's and HAP's respectively; and Ivanina et al. (2009) in oysters exposed at thermal stress and cadmium; it has also been reported in other oysters species as *Crassostrea gigas*, *Ostrea edulies*, *Mytilus edulies*, *Dressenia polymorfa*; but any reported on natural conditions.

The HSP family has been used as protein biomarkers, has evaluated in bioindicator organisms such as bivalves, particularly oysters, in environmental assessment since their expression allows the detection of damages caused by any kind of stressor, and it is possible to apply the results onto the rest of the ecosystem biota (LeBlanc & Bain, 1997; Eason & O'Halloran, 2002; Zurita et al., 2005). Marine mollusks, such the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) have been used worldwide as bioindicators to assess the impact of pollutants in coastal lagoons ecosystems. It is due to the reason that they are widely distributed and their capability to respond to natural impacts such as hurricanes, storms, extreme rainfall, or pollution,



and its ability of synthesized stress response proteins to protect homeostasis during environmental fluctuations.

Coastal lagoons are ecosystems with high primary productivity, oxygen producer and sustain reproduction and nurseries for alimentary and economically important species (Geffard et al., 2007; Macauley, Summers, & Engle, 1997). Environmental monitoring of coastal lagoons by direct measurements in water and sediment coupled with biomarker assessment in bioindicator organisms would provide information to prevent, legislate and remediate the effects of pollution.

The brackish Tuxpam-Tampamachoco estuarine-lagoon system is located at the north of Veracruz, Mexico, the lagoon is approximately 2 km from the ocean. This site encounters one regime of summer rains and a season of rains accompanied by cold wind from the north during winter, locally known as “north winds season” with the entry of humidity from the

Gulf of Mexico, which makes up more than 10.2 % of the total annual rains (Fig. 1).

To our knowledge, up today, there are few protein related ecotoxicological studies in Tampamachoco Lagoon. However the research group led by Botello, De la Lanza, & Villanueva (2016) evaluated sediment cores from the brackish Tuxpam-Tampamachoco estuarine-lagoon system to reconstruct the environmental conditions, through deposition of the sediment, from 1908 to 2010, finding contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH's), metals and pesticides, with a maximum in 1990-1995. Trends indicate that the concentrations decreased in time. These concentrations became lower than the Effects Range-Low (ERL) and Effects Range-Median (ERM) (Long, Macdonald, Smith, & Calder, 1995), so they no longer cause damage in benthic organisms.

The seasonal pattern of the baseline expression of proteins should be established with the

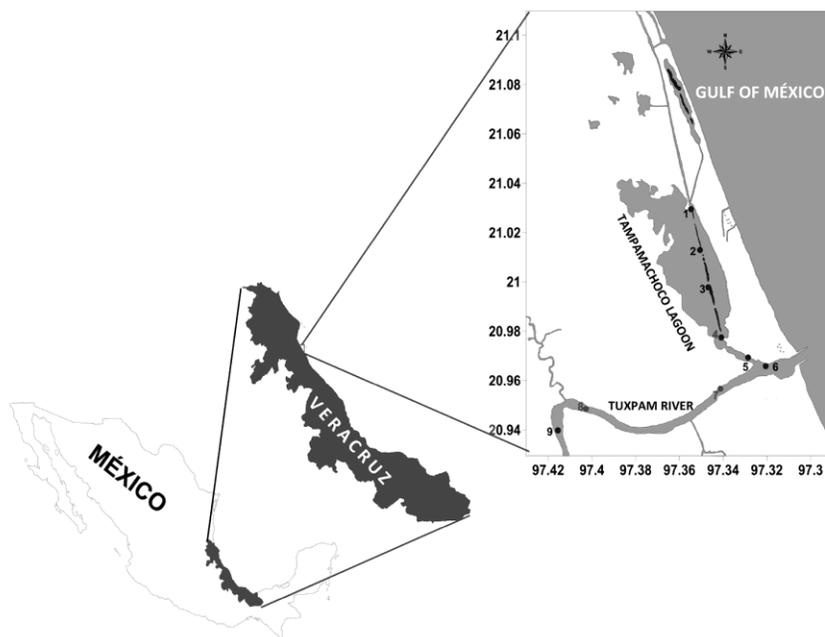


Fig. 1. Brackish Tuxpam-Tampamachoco estuarine-lagoon system.

purpose of identifying the baseline constraints and tradeoffs generated by natural conditions (Portner, 2001). The aim of this work was to analyze the expression of the HSP70 family as an exposure biomarker using *C. virginica* gills from individuals and groups of oysters from the Tampamachoco Lagoon under natural conditions at different seasons and thermal stressed.

MATERIALS AND METHODS

Physical chemistry parameters: Physical chemistry parameters, such as pH, temperature (°C), dissolved oxygen (DO₂ mg/L), and salinity were measured at ten geographical inside the brackish estuarine-lagoon system in both dry and north winds seasons during the collections (Fig. 1). They should not be considered in an isolated way; for instance, salinity, DO₂ and temperature combined caused changes in protein expression from the dry season samples.

***C. virginica* samples:** Forty-five oysters were sampled at collection station into Tampamachoco Lagoon during both the dry season (April 2013) and the North winds season (January 2014). Ten individuals from each season were randomly used as individual samples and the rest of the sampled oysters were used as grouped samples. Oysters were chipped and the gills were dissected and placed in RIPA lysis buffer at 4 °C until further analysis (N = 90).

Ten oysters from each season were placed in a 96 liter aquarium filled with artificial sea water made with Instant Ocean® (Kent Marine, Acworth, GA, USA) under the following conditions: pH 7.9; NH₃-NH₄, > 0.02 mg/L; PO₄, 0.25 mg/L; NO₃, > 5 mg/L; NO₂, > 0.1 mg/L; temperature 23 ± 2 °C; salinity 20; and fed with Marine Snow (Two Little Fishes Inc.) at approximately 1x10¹⁰ cells per liter. Twenty-one days later, the organisms were exposed to thermal stress (42 °C) for 2 hours, and protein analysis was performed both individually and in-group samples and were used as the positive control (PC).

Protein extraction, quantification and

PAGE: Frozen samples were crushed and centrifuged at 16000×g for 10 minutes. The supernatant was frozen at -20 °C until analysis. The protein quantification was performed by the Bradford (1976) method: 30 µg of protein was diluted in sample buffer (Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8; glycerol 30 %; SDS 4 %; and 5 % bromophenol blue) at a 1:2 proportion, then boiled for 5 min at 95 °C and immediately loaded onto a 10 % polyacrylamide gel topped with 4 % polyacrylamide stacking gels (Laemmli, 1970). PAGE (electrophoresis) was run for 2 hours at 25 mA by gel in a Mini-PROTEAN Tetra Cell electrophoresis chamber (Bio-Rad) with running buffer (25 mM Tris; 192 mM glycine; and 0.1 % SDS, pH 8.3) at room temperature. Gels were fixed for one hour with fixing solution (40 % ethanol and 10 % acetic acid); then they were stained for 1 hour with 0.25 % Coomassie Brilliant Blue G-250 dissolved in fixing solution; and finally de-stained with the fixing solution. Two types of PAGE were run: one with ten individuals from each season and two stressed individuals and one with five groups of five individuals from each season and four groups of five stressed individuals were loaded in each lane (N = 90).

Immunodetection: After electrophoresis, the proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad 162-0112) using a transfer buffer (glycine 0.192 M; Tris 0.025 M; and 20 % methanol v/v); the transfer was carried out 1:30 hours using a Criterion-Blotter (Bio-Rad 170-4071) at 120 V immersed in ice. The nitrocellulose membranes were then blocked for 1 hour in PBST₂₀ blocking buffer (1.4 mM KH₂PO₄; 8 mM Na₂HPO₄; 140 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 0.1 % Tween20; and 5 % nonfat dry milk, pH 7.4). Blots were incubated overnight at 14 °C with anti-HSP70 (Sigma H5147) and were rinsed three times (10 min) with PBST; then, they were incubated for two hours at room temperature with anti-mouse IgG (Sigma A9044). Excess secondary antibody



was removed by three washes (10 min) with PBST, and the sites of the binding antibody were visualized by incubation with Clarity Western ECL-Substrate (17050060 Bio-Rad).

Image analysis: The molecular weight from visible lanes in PAGE was determined with Rf values obtained from acrylamide gel images (Lambin, Rochu, & Fine, 1976). Immunodetection images were captured with an LG-1500 photo-documenter, and relative intensity units (RIU) were quantified with ImageJ software (Schneider, Rasband, & Eliceiri, 2012). The RIU for each isoform was calculated by taking the ratio between each band's RIU with its own RIU actin band. The results are expressed as the average of three independent assays.

Statistical Analysis: The physicochemical parameters of water were compared with Student's T-test. Protein expression differences were analyzed for statistical significance using one-way ANOVA, and pair-wise comparisons were performed according to Tukey's HSD method if a significance difference was detected. Significance was considered at $P > 0.05$ the statistical analysis was performed using IBM SPSS Statics software (IBM, 2017).

RESULTS

Physical chemistry parameters: Physical chemistry parameters in water were measured along the Tuxpam-Tampamachoco brackish estuarine-lagoon system at ten geographical points in both seasons (Table 1). The average values were pH of 8.5 ± 0.19 and 8.29 ± 0.12 ; temperature of 26.04 ± 0.93 and 19.10 ± 0.32 °C; salinity of 31.07 ± 4.59 and 31.40 ± 3.72 ; and DO₂ of 10.15 ± 2.56 and 6.21 ± 0.68 mg/L in the dry and north winds seasons, respectively. Differences in temperature and DO₂ were statically significant, but pH and salinity were similar for both seasons, both with a 95 % confidence interval ($P < 0.05$).

Sample characterization: The average oyster weight was 58 ± 5.2 g and 51 ± 7.1 g; the average size was 7.40 ± 1 cm and 6.8 ± 0.6 cm; and the average protein yield was 5.9 ± 2 mg/g and 7.5 ± 1.9 mg/g from the dry and north winds seasons, respectively, all of them without statically significant difference with a 95 % confidence interval ($P < 0.05$).

PAGE-SDS: The electrophoretic pattern of total soluble proteins from individuals and five grouped samples of *C. virginica* gills from the dry season, the north winds season,

TABLE 1
Physical chemistry parameters measured in the dry and north winds seasons

	Geographical points		pH		Temperature (°C)		Salinity (UPS)		DO ₂ (mg/L)	
	Latitude	Longitude	Dry	Norths	Dry	Norths	Dry	Norths	Dry	Norths
1	97°35'47"	21°02'94"	8.08	8.08	26.00	19.00	33.94	26.00	7.23	6.49
2	97°35'04"	21°01'25"	8.25	8.21	26.00	19.00	33.88	34.00	8.21	5.35
3	97°34'66"	20°99'75"	8.38	8.44	25.00	19.00	33.87	33.00	8.44	6.11
4	97°34'08"	20°97'72"	8.37	8.43	25.00	19.00	33.75	34.00	8.24	5.35
5	97°32'94"	20°96'91"	8.40	8.39	25.00	19.00	34.10	30.00	8.25	7.26
6	97°32'05"	20°96'60"	8.49	8.24	26.00	19.00	31.44	35.00	10.27	7.10
7	97°34'11"	20°95'44"	8.61	8.21	27.00	19.00	27.07	36.00	14.44	6.57
8	97°40'27"	20°94'86"	8.71	8.40	28.00	19.00	24.39	31.00	13.57	6.34
9	97°41'56"	20°93'98"	8.65	8.25	27.00	19.00	22.77	30.00	12.66	5.50
10	97°30'59"	20°26'90"	8.53	8.28	25.00	20.00	35.50	25.00	10.19	6.04



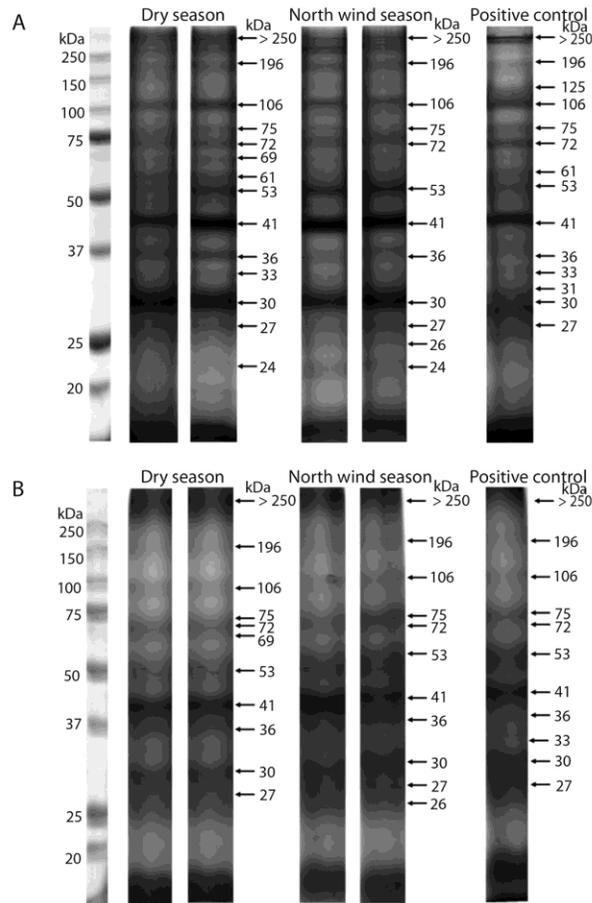


Fig. 2. Total soluble protein electrophoretic patterns from *C. virginica* gills. Each lane represents the protein from one individual (A) and grouped samples (B). The first lane is the molecular weight marker.

and PC are shown in figure 2 (Fig. 2). Similar concentrations of protein were loaded in each lane; nevertheless, different patterns of bands were observed between seasons. For example, the 125 kDa band appeared only in individual samples of the positive control. Another 69 kDa band appears only in the dry season, in both individual and clustered samples. Also, a 61 kDa band was observed in the dry season, only in individual samples, but not after pooling (Table 2).

Immunodetection: The anti-HSP70 immunodetection of proteins from oyster gills showed the presence of three isoforms, HSP73, HSP72 and HSP69, in both, the individual and grouped samples; although the first two were expressed in all samples, HSP69 was only expressed in both individual and grouped samples from the dry season (Fig. 3).

HSP expression levels seasonal variation: Semi-quantitative expression analysis of HSP was done on three isoforms, HSP73, HSP72 and HSP69, using RIU. The average HSP73



TABLE 2
Bands observed in PAGE from Individual or Grouped Samples of oyster gills

Molecular weight (kDa)	SEASON		CONTROL
	Dry Season	North winds season	Positive control
125	—	—	Individual
69	Individual and Group samples	—	—
61	Individual	—	—
33	Individual	—	Individual
26	—	Individual and Group samples	—
24	Individual	Individual	—

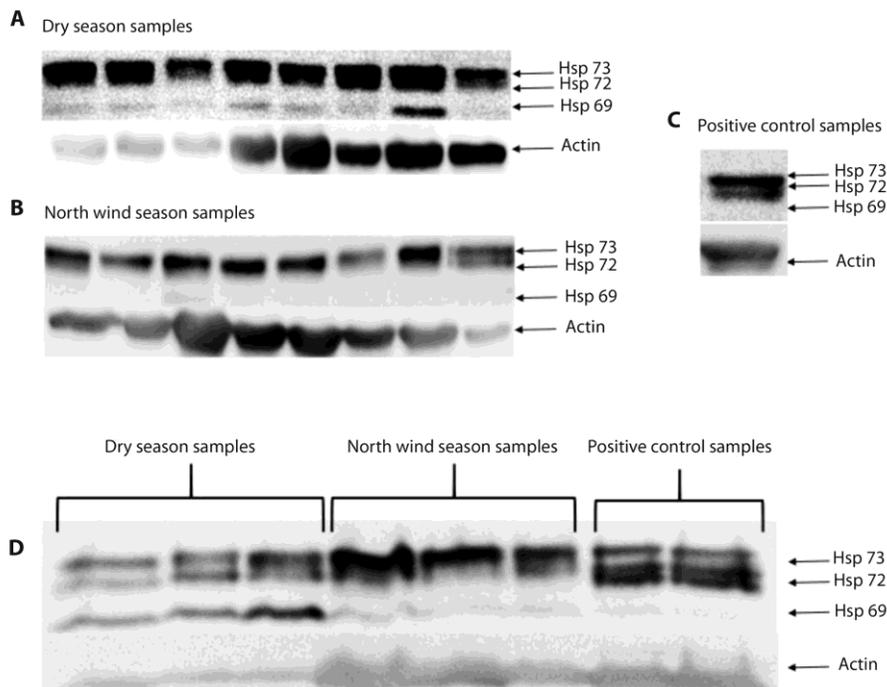


Fig. 3. Representative HSP family immunodetection. In individual (A, B, C) and grouped (D) samples: HSP73 and HSP72 isoform expression is observed in all samples, and the HSP69 isoform can only be observed in both individual (A, B) and grouped (D) samples in the dry season.

from individual and grouped samples was 1.30, 0.52, 0.44, 0.40, 0.66 and 0.21 RIU, respectively (Fig. 4), and the dry season and PC individual samples showed higher expression than the other ones.

The average HSP72 from individual and grouped samples was 0.19, 0.66, 0.09, 0.33, 0.42 and 0.20 RIU, respectively (Fig. 5). The grouped dry season and individual PC samples showed higher expression than the other ones.

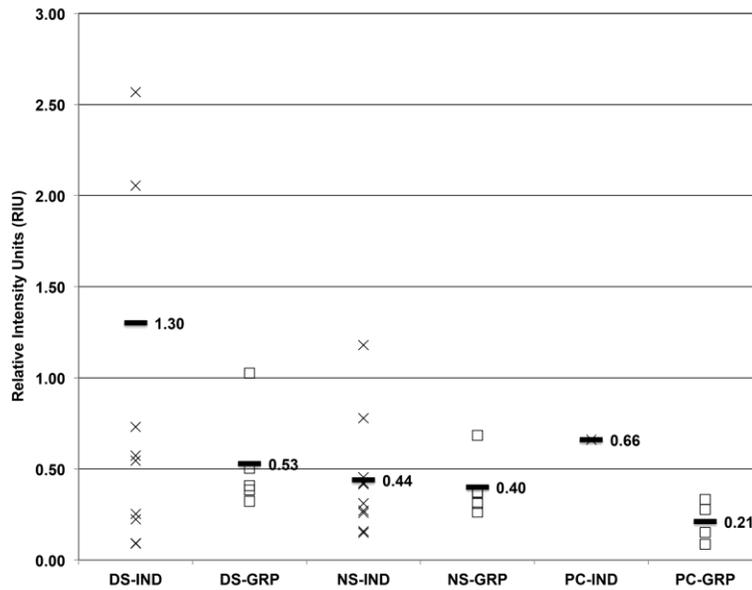


Fig. 4. HSP73 expression (RIU) in *C. virginica* gills from the dry season (DS), north winds season (NS) and positive control (PC) measured on individual (IND-X) and grouped (GRP-□) samples. Average (—) from individual and grouped samples.

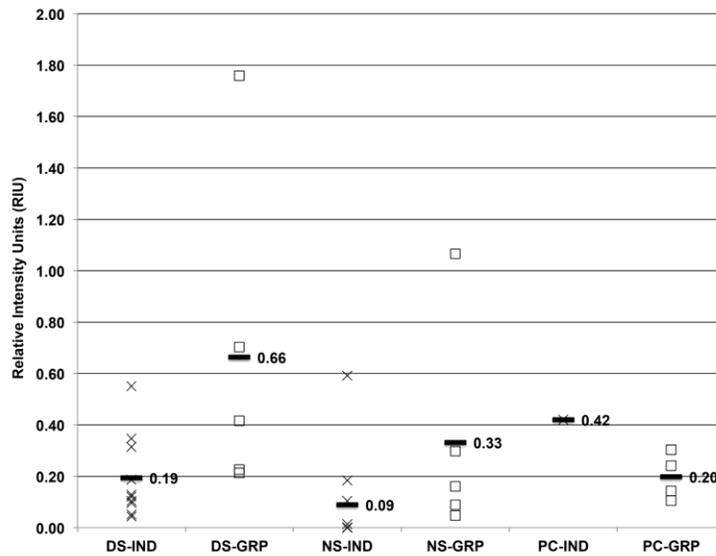


Fig. 5. HSP72 expression (RIU) in *C. virginica* gills from the dry season (DS), north winds season (NS) and positive control (PC) measured on (IND-X) and grouped (GRP-□) samples. Average (—) from individual and grouped samples.



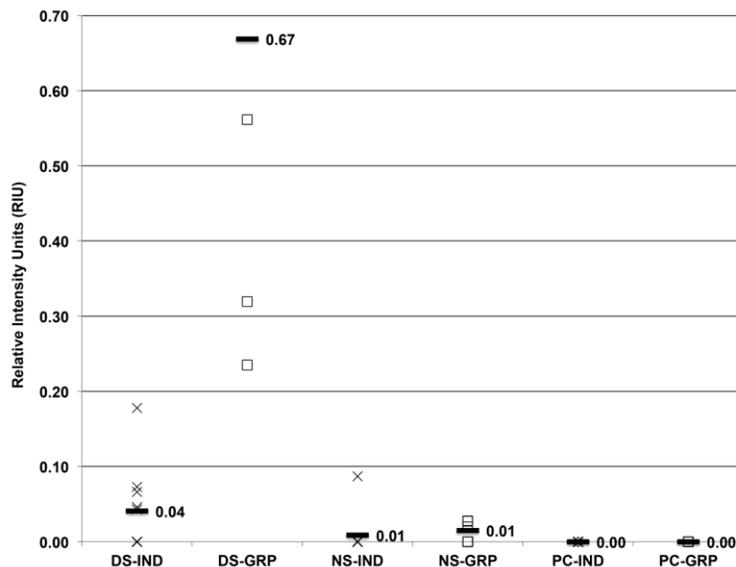


Fig. 6. HSP69 expression (RIU) in *C. virginica* gills from the dry season (DS), north winds season (NS) and positive control (PC) measured on individual (X) and grouped (—) samples.

The average HSP69 from individual and groups samples was 0.04, 0.67, 0.01, 0.01, 0.00 and 0.00 RIU, respectively (Fig. 6). This isoform was expressed in 50 % and 100 % of individual and grouped samples, respectively, from the dry season, and its expression in other samples was not significant.

Statistically (ANOVA), HSP73 and HSP72 expressions did not show significant differences among seasons, individual and grouped samples with a 95 % confidence interval ($P < 0.05$). However, HSP69 expression in individual and grouped samples was significantly different with a 95 % confidence interval ($P < 0.05$) in the dry season in comparison to the other seasons.

DISCUSSION

Similar to this work, there are studies where HSP expression is used as a stress biomarker in oysters. Snyder, Girvetz, & Mulder

(2001) examined HSP responses of *Mytilus galloprovincialis* and *Haliotis rufescens* exposed to thermal stress, degraded oil, heptachlor, phenobarbital, β -naphthoflavone and pentachlorophenol; Hamdoun, Cheney, & Cherr (2003) assessed HSP protein and *hsp* gene expressions as a response to heat stress in *Crassostrea gigas*, and Piano et al. (2002) evaluated HSP protein expression in *Ostrea edulis* exposed to heat stress. All these studies analyzed exposed organisms to a specific stressor, but none analyzed HSP from oyster gills in natural conditions.

When PAGE was analyzed, different protein expression was observed regardless of the sample (individual or grouped) or season. Because these results were repeated and consistent, it would be interesting to identify the different proteins present in each season to propose them as biomarkers.

In this work, we found three HSP isoform expressions (HSP73, HSP72 and HSP69) from

the gills of oysters collected in two different seasons from a site reported to have little pollution (Botello et al., 2016) relative to concentrations that are known to affect benthic organisms (Long et al., 1995). It is possible that this expression has been generated due to fluctuations in physical chemistry parameters, particularly in HSP69, since it was only expressed in the dry season, where the salinity (31 UPS) and dissolved oxygen (10.1 mg/L) were higher than recommended by Shumway (1996), and United Nations Environment Programme (14-28UPS; and 9.5 mg/L at < 20 °C, respectively). In addition to these parameters, the temperature was 26 °C in the dry season, warmer temperatures led to earlier and greater growth rates, and the larger final size increased the metabolic activity of the oysters (Abbe, Riedel, & Sanders, 2000). In the dry and north winds seasons, the pH was approximately 8, which is within the range of optimal pH for brackish waters; therefore, this parameter did not have an influence on HSP expression.

The HSP family isoform expression seems to be species and stressor dependent; for example, Chapple, Smerdon, & Hawkins (1997) reported the HSP78, HSP72 and HSP70 isoforms expression in *M. edulis*, but they did not determine if they were constitutive or induced. Snyder et al. (2001) reported that the HSP74, HSP70 and HSP67 isoforms were induced in *Mytilus galloprovincialis* and *Halio-tis rufescens* when exposed to thermal stress and xenobiotics (e.g., 2-methoxyethanol). Cruz-Rodríguez & Chu (2002) stated that the HSP71 and HSP69 isoforms expression was induced when *C. virginica* was exposed to aromatic polycyclic hydrocarbons. Hamdoun et al. (2003) and Piano et al. (2002) found HSP77 and HSP72 to be constitutive isoforms, and HSP69 an induced isoform by thermal stress in *C. gigas* and *Ostrea edulis*, respectively. In this work, HSP73 isoform expression was present in all samples, HSP72 isoform expression was variable, and HSP69 was only expressed in individual and grouped dry season samples. The HSP73 isoform has not previously been reported in *C. virginica* adults.

Boutet, Tanguy, Rousseau, Auffret, & Moraga (2003) found an inverse relationship between the expression of HSP70 and metal concentrations in *C. gigas*. In other species of bivalves, Piano, Valbonesi, & Fabbri (2004) reported that after thermal stress, induced isoforms were not expressed in *M. galloprovincialis*, *Tapes philippinarum* and *Scapharca inaequivalvis*, nevertheless, the constitutive isoforms were significantly elevated. The HSP expression from PC oysters that were under thermal stress was lower than that of the wild oysters. Of particular interest is the expression of HSP69 during the dry season, where more than 50 % of the dry season individual and grouped samples expressed it, without losing sight of the fact that pollution has gradually declined (Botello et al., 2016). This expression was also observed by Piano et al. (2002) in *O. edulis* and Hamdoun et al. (2003) in *C. gigas*, who proposed that this isoform was induced by heat stress; Cruz-Rodríguez & Chu (2002) reported it in *C. virginica* as a response to polycyclic aromatic hydrocarbons.

The challenge of using proteins as biomarkers is determining the range of basal expression and the moment at which they are expressed due to an adverse effect or compensatory response that protects the organism against environmental damage or xenobiotics (Chapple et al., 1997; Farcy et al., 2009; Luna-Acosta, Bustamante, Godefroy, Fruitier-arnaudin, & Thomas-guyon, 2010). Therefore, it is essential to determine the baseline levels of HSP before comparison with data from contaminated sites. Moreover, as we studied individual and grouped samples, the interpretation of the results was improved in comparison to most reports that were made with organism's pulls.

The present study demonstrates that the HSP70 family of proteins could be used as unspecific stress biomarker in oysters. Environmental conditions have been shown to have an effect on *C. virginica* protein expression because of the different electrophoretic patterns obtained from the total soluble proteins of gills, as well as the different expression levels of the HSP family isoforms. Studies on the changes



in environmental conditions, such as pH, temperature, DO₂, and salinity, should be directed towards measuring the damage they cause at the sub-cellular, cellular and tissue levels before exposure of an organism to any xenobiotic. The stress could be detected not only by the expression of inducible HSP70 isoforms but also by the expression levels of constitutive isoforms, which can be over-expressed or inhibited depending on environmental conditions. The main difficulty in assessing biomarkers is the natural interference of environmental factors with biological responses, making the interpretation rather difficult.

This work presents similar results obtained from both individual and grouped samples; although the evaluation of individual organisms slightly increased the variability, this handling offers the opportunity to more accurately determine if environmental changes affect low biological scale levels.

Ethical statement: authors declare that they all agree with this publication and made significant contributions; that there is no conflict of interest of any kind; and that we followed all pertinent ethical and legal procedures and requirements. All financial sources are fully and clearly stated in the acknowledgements section. A signed document has been filed in the journal archives.

ACKNOWLEDGMENTS

Posgrado en Biología Experimental, Universidad Autónoma Metropolitana. CONACYT México scholarship 39050, and register number 233324. Funding: This study was partially supported by CONACYT project 0105961-M and the project ECOS Nord-MEXICO-FRANCE, SEP-CONACYT M10-A02 between the Universidad Autónoma Metropolitana and the Université of Lille 1 Sciences et Technologies. Edmundo Bonilla-González and Iván Bahena-Ocampo for the technical advice. The authors declare no conflicts of interest.

RESUMEN

Potencial de la familia de proteínas HSP70 como biomarcador de *Crassostrea virginica* en condiciones naturales (Ostreoida: Ostreidae). Las proteínas HSP70 se utilizan como biomarcadores de exposición y el ostión *Crassostrea virginica* es considerado como un organismo bioindicador en evaluaciones ambientales. De acuerdo con la estación, el nivel de expresión de la familia de las HSP70 en ostiones silvestres no ha sido caracterizado. El objetivo de este trabajo fue analizar la expresión de la familia de las proteínas HSP70 como un biomarcador de exposición utilizando branquias de *C. virginica* de manera individual y grupal bajo condiciones naturales. Noventa muestras de ostión se recolectaron en un sitio dentro de la Laguna Tampamachoco durante las estaciones de secas y "nortes". Un grupo se mantuvo bajo condiciones de laboratorio y expuesto a estrés térmico. El pH, la temperatura, la salinidad y el oxígeno disuelto (DO₂) se midieron dentro del sistema salobre Tuxpan-Tampamachoco. La salinidad y el DO₂ estuvieron fuera de los límites recomendados para sistemas salobres en ambas estaciones. La electroforesis y el ensayo de inmunodetección se llevaron a cabo con branquias de ostiones. Las isoformas HSP73, HSP72 y HSP69 se expresaron en tejido de las muestras de la época de secas, mientras que solamente las isoformas HSP73 y HSP72 se detectaron en tejido de las muestras de época de nortes y control positivo. La isoforma HSP73 no ha sido reportada previamente en *C. virginica*. Para evaluar la expresión de la familia de las proteínas HSP70 a nivel individual y grupal de organismos silvestres es importante determinar una línea de base de expresión estacional.

Palabras clave: biomarcador; proteínas de estrés térmico; evaluación ambiental; *Crassostrea virginica*.

REFERENCES

- Abbe, G. R., Riedel, G. F., & Sanders, J. G. (2000). Factors that influence the accumulation of copper and cadmium by transplanted eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in the Patuxent River, Maryland. *Marine Environmental Research*, 49(4), 377-396.
- Ait-Aissa, S., Porcher, J., Arrigo, A., & Lambre, C. (2000). Activation of the hsp70 promoter by environmental inorganic and organic chemicals: relationships with cytotoxicity and lipophilicity. *Toxicology*, 145(2-3), 147-157.
- Arya, R., Mallik, M., & Lakhota, S. C. (2007). Heat shock genes - integrating cell survival and death. *Journal of Biosciences*, 32(3), 595-610.
- Botello, A. V., De la Lanza, E. G., & Villanueva, F. S. (2016). *Laguna de Tampamachoco, Veracruz, México. Características y Diagnóstico Ambiental*



2009-2012. Ciudad de México, México: Editorial Académica Española.

- Boutet, I., Tanguy, A., Rousseau, S., Auffret, M., & Moraga, D. (2003). Molecular identification and expression of heat shock cognate 70 (hsc70) and heat shock protein 70 (hsp70) genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Cell Stress Chaperon*, *8*(1), 76-85.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*, 248-254.
- Chapple, J. P., Smerdon, G. R., & Hawkins, A. J. S. (1997). Stress-70 protein induction in *Mytilus edulis*. Tissue-specific responses to elevated temperature reflect relative vulnerability and physiological function. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *217*, 225-235.
- Cruz-Rodríguez, L. A., Baucum, A. J., Soudant, P., Chu, F. L. E., & Hale, R. C. (2000). Effects of PCBs sorbed to algal paste and sediments on the stress protein response (HSP70 family) in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Marine Environmental Research*, *50*, 341-345.
- Cruz-Rodríguez, L. A., & Chu, F. L. E. (2002). Heat-shock protein (HSP70) response in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, exposed to PAHs sorbed to suspended artificial clay particles and to suspended field contaminated sediments. *Aquatic Toxicology*, *60*, 157-168.
- Eason, C., & O'Halloran, K. (2002). Biomarkers in toxicology versus ecological risk assessment. *Toxicology*, *181-182*, 517-521.
- Farcy, E., Voiseux, C., Lebel, J. M., & Fievet, B. (2009). Transcriptional expression levels of cell stress marker genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to acute thermal stress. *Cell Stress Chaperon*, *14*(4), 371-380.
- Fent, K. (2004). Ecotoxicological effects at contaminated sites. *Toxicology*, *205*(3), 223-240.
- Gazeau, F., Quiblier, C., Jansen, J. M., Gattuso, J. P., Middelburg, J. J., & Heip, C. H. R. (2007). Impact of elevated CO₂ on shellfish calcification. *Geophysical Research Letters*, *34*. DOI: 10.1029/2006GL028554
- Geffard, A., Geffard, O., Amiard, J. C., His, E., & Amiard-Triquet, C. (2007). Bioaccumulation of metals in sediment elutriates and their effects on growth, condition index, and metallothionein contents in oyster larvae. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *53*, 57-65.
- Hamdoun, A. M., Cheney, D. P., & Cherr, G. N. (2003). Phenotypic plasticity of HSP70 and HSP70 gene expression in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): implications for thermal limits and induction of thermal tolerance. *Biological Bulletin*, *205*(2), 160-169.
- Ivanina, A. V., Taylor, C., & Sokolova, I. M. (2009). Effects of elevated temperature and cadmium exposure on stress protein response in eastern oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Aquatic Toxicology*, *91*(3), 245-254.
- IBM Corp. (2017). *IBM SPSS Statistics for Macintosh* (Version 25.0). Armonk, NY: IBM Corp.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*(5259), 680-685.
- Lambin, P., Rochu, D., & Fine, J. M. (1976). A new method for determination of molecular weights of proteins by electrophoresis across a sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gradient gel. *Analytical Biochemistry*, *74*(2), 567-575.
- LeBlanc, G. A., & Bain, L. J. (1997). Chronic Toxicity of Environmental Contaminants: Sentinels and Biomarkers. *Environmental Health Perspectives*, *105*(Suppl. 1), 65-80.
- Long, E. R., Macdonald, D. D., Smith, S. L., & Calder, F. D. (1995). Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. *Environmental Management*, *19*, 81-97.
- Luna-Acosta, A., Bustamante, P., Godefroy, J., Fruitier-arnaudin, I., & Thomas-Guyon, H. (2010). Seasonal variation of pollution biomarkers to assess the impact on the health status of juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* exposed in situ. *Environmental Science and Pollution Research International*, *17*(4), 999-1008.
- Macauley, J. M., Summers, J. K., & Engle, V. D. (1997). Estimating the ecological condition of the estuaries of the gulf of Mexico. *Environmental Monitoring and Assessment*, *57*, 59-83.
- Ortiz-Zarragoitia, M., & Cajaraville, M. P. (2006). Biomarkers of exposure and reproduction-related effects in mussels exposed to endocrine disruptors. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *50*, 361-369.
- Piano, A., Asirelli, C., Caselli, F., & Fabbri, E. (2002). Hsp 70 expression in thermally stressed *Ostrea edulis*, a commercially important oyster in Europe. *Cell Stress Chaperon*, *7*(3), 250-257.
- Piano, A., Valbonesi, P., & Fabbri, E. (2004). Expression of cytoprotective proteins, heat shock protein 70 and metallothioneins, in tissues of *Ostrea edulis* exposed to heat and heavy metals. *Cell Stress Chaperon*, *9*(2), 134-142.
- Portner, H. O. (2001). Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften*, *88*(4), 137-146.
- Sarkar, A., Ray, D., Shrivastava, A. N., & Sarker, S. (2006). Molecular Biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology*, *15*(4), 333-340.



- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 671-675.
- Shumway, S. E. (1996). Natural Environmental Factors. In V. S. Kennedy, R. I. E. Newell, & A. F. Eble (Eds.), *The Eastern Oyster Crassostrea virginica* (pp. 719). Maryland, U.S.A.: Maryland Sea Grant College.
- Snyder, M. J., Girvetz, E., & Mulder, E. P. (2001). Induction of marine mollusc stress proteins by chemical or physical stress. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *41*(1), 22-29.
- Zurita, J. L., Jos, A., del Peso, A., Salguero, M., Lopez-Artiguez, M., & Repetto, G. (2005). Ecotoxicological evaluation of the antimalarial drug chloroquine. *Aquatic Toxicology*, *75*(2), 97-107.



