



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



EFFECTO EN LA EXPRESIÓN DE GENES DE RESPUESTA A ESTRES OCASIONADO POR LA EXPOSICIÓN DE *Crassostrea gigas* A *Prorocentrum lima* (PRL-1).

M.C. Reyna de Jesús Romero Geraldo y Dra. Norma Y. Hernández-Saavedra, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C (Biotecnología), La Paz BCS, 23090. rgeraldo@cibnor.mx

Palabras clave: *Crassostrea gigas*; Respuesta de estrés; Expresión genes; FAN

Introducción. En su medio natural, los bivalvos al ingerir fitoplancton ingieren también las toxinas que producen algunas especies que forman parte del grupo de organismos que ocasionan los eventos conocidos como Floraciones Algaes Nocivas (FAN)⁽¹⁾. *Prorocentrum lima* (cepa PRL-1) es un dinoflagelado, planctónico y bentónico, tóxico, productor de toxinas diarreicas (o DSP, diarrhetic shellfish poison, por sus siglas en inglés)⁽²⁾. En la actualidad, los estudios encaminados a dilucidar el efecto de la exposición de moluscos bivalvos a dinoflagelados tóxicos se realiza principalmente a nivel de comportamiento y respuesta fisiológica⁽³⁾, en tanto que la respuesta molecular resulta casi desconocida. En este trabajo, usando como modelo *C. gigas* y *P. lima*, se presentan los resultados del seguimiento de la expresión de genes que codifican proteínas de estrés tales como: Glutamina sintetasa (GS); Glutación-S-transferasa (GST); HSP₇₀; CuZn SOD y Peroxidasa melanogénica (POX), considerando como variables el tiempo de exposición (exposición aguda y sub-crónica) y la densidad del dinoflagelado.

Metodología. Se expusieron juveniles de *C. gigas* (3 a 5 mm) a 300, 3000 y 30000 cels/mL de *P. lima* PRL-1. Se utilizó *Isochrysis galbana* como dieta no tóxica y en los controles. La respuesta aguda se determinó muestreando a las cero, 3, 6, 24 h de exposición, mientras que la respuesta sub-crónica se determinó a los cero, 1, 3, 7 y 14 días. Se extrajo ARN total (TRIzol®, Invitrogen) de 21 muestras control y 63 muestras experimentales ($n = 5$) con el que se sintetizó ADNc (Cloned AMV First Strand cDNA Syntesis Kit®, Invitrogen). La amplificación de fragmentos específicos de los genes GS, GST, SOD-CuZn, POX y HSP₇₀ se realizaron mediante PCR en reacciones que contenían 50 mM de MgSO₄ y 12.5 pmol de cada primer. Los amplicones se cargaron en geles de agarosa-Synergel-TBE y la señal de cada banda se cuantificó con el software UVIDOC V.97. Se probó la normalidad y homogeneidad de varianza de datos. El análisis se realizó entre variables tiempo-tratamiento-gene para identificar diferencias entre cada condición. Se realizaron comparaciones post-hoc entre medias con la prueba de Tukey. La significancia estadística se fijó en $P < 0.05$.

Resultados. El resumen de las respuestas encontradas para cada gen se presenta en la Tabla 1. La POX no mostró un perfil de expresión variable, mientras que los demás genes mostraron el efecto de la exposición a *P. lima* (DSP). La variación más notoria, en el perfil de

expresión se observó a una concentración de 3000 cels/mL, además de mostrar una fuerte regulación tiempo-dependiente (6 h), mientras que la regulación de expresión *P. lima*-dependiente se detectó débilmente a una densidad de 30000 cels/mL. El análisis HSD de Tukey demostró que a pesar de la claridad de los patrones de expresión, sobre incremento y disminución a los diferentes tiempos y concentraciones de reto expuestos, las diferencias de expresión de genes son más significativas cuando se comparan los datos de los organismos expuestos durante 6 h con los expuestos durante 14 días.

Tabla 1. Resumen del efecto de la exposición de *C. gigas* a *P. lima* (cels/mL). Statistical test (HSD-Tukey).

Gene	agudo (hrs)				sub-crónico (días)				
	0	3	6	24	0	1	3	7	14
Glutamina sintetasa									
300	- ^c	- ^c	+ ^d	+ ^d	+ ^u	+ ^d	- ^c	+ ^d	+ ^u
3000	+ ^u	+ ^d	+ ^d	+ ^d	+ ^u	+ ^d	- ^c	+ ^d	+ ^u
30000	- ^c	- ^c	+ ^u	+ ^d	- ^c	+ ^d	- ^c	- ^c	- ^c
Glutación-S-transferasa									
300	- ^c	- ^c	+ ^d	+ ^d	- ^c	+ ^d	+ ^d	+ ^d	+ ^u
3000	- ^c	- ^c	+ ^d	+ ^d	- ^c	+ ^d	+ ^d	- ^c	+ ^u
30000	- ^c	- ^c	+ ^d	+ ^d	- ^c	+ ^d	- ^c	+ ^d	- ^c
HSP70									
300	- ^c	- ^c	+ ^d	+ ^d	+ ^d	+ ^d	+ ^u	+ ^u	+ ^u
3000	+ ^u	+ ^d	+ ^u	- ^c	+ ^u	- ^c	+ ^d	+ ^d	+ ^u
30000	- ^c	- ^c	+ ^d	+ ^d	+ ^d	+ ^d	+ ^u	- ^c	- ^c
Superóxido dismutasa CuZn									
300	- ^c	- ^c	+ ^d	- ^c	- ^c	- ^c	- ^c	- ^c	- ^c
3000	+ ^u	- ^c	+ ^d	- ^c	+ ^u	- ^c	- ^c	- ^c	+ ^u
30000	- ^c	- ^c	+ ^d	- ^c	+ ^d	- ^c	- ^c	- ^c	- ^c

-^c sin variación significativa 5% respecto al control. +^u sobreexpresión y +^d sub-expresión significativa 5%.

Conclusiones. Durante las primeras horas de exposición la expresión de los genes estudiados, respecto a su condición basal, es inmediata ante la presencia de *P. lima* (t_0). Para cada gen monitoreado, a las 3 h se observa una disminución en la tasa metabólica con una recuperación significativa a las 6 h. Sin embargo, para la condición experimental de 30000 cels/mL de *P. lima* durante 14 días de exposición los organismos presentan un fuerte (e irreversible) deterioro metabólico.

Agradecimientos. Al CIBNOR y al CONACYT, por el financiamiento para la realización de este trabajo a través de los proyectos EP 3.0 y P083442 respectivamente, y al CONACyT por la beca 95202.

Bibliografía.

- Bauder AG, Cembella AD, Bricelj VM and Quilliam MA. (2001) *Mar Ecol Prog Ser.*, 213:39-52
- Heredia-Tapia, A., Arredondo-Vega, B.O., Núñez-Vázquez, E.J., Yasumoto, T., Yasuda M., Ochoa, J.L. (2002). *Toxicon*, 40:1121-1127.
- Bauder A.G. y Cembella A.D. (2000). *JSR*, 19:321-324.