

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS**



**“EFECTO DE HIDROCARBUROS EN EL DESARROLLO GONADAL DE  
*Crassostrea virginica*: APROXIMACIÓN TRANSCRIPTÓMICA”**

**T E S I S**

**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS  
PARA OBTENER EL GRADO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR y  
BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA**

**SANDRA TAPIA MORALES**

**ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. ENERO 2019**

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS  
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR y BIOTECNOLOGÍA

**“EFECTO DE HIDROCARBUROS EN EL DESARROLLO GONADAL DE  
*Crassostrea virginica*: APROXIMACIÓN TRANSCRIPTÓMICA”**

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA  
OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

**SANDRA TAPIA MORALES**

Aprobada por:




---

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez  
Co-Directora de tesis



---

Dra. Ivone Giffard Mena  
Co-Directora de tesis




---

Dr. Edgar A. López Landavery  
Sinodal



---

Dr. Fernando Díaz Herrera  
Sinodal



---

Dra. Nancy Ramírez Álvarez  
Sinodal

**RESUMEN** de tesis que presenta **Sandra Tapia Morales**, como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ecología Molecular y Biotecnología con orientación en Biotecnología Marina.

**“EFECTO DE HIDROCARBUROS EN EL DESARROLLO GONADAL DE  
*Crassostrea virginica*: APROXIMACIÓN TRANSCRIPTÓMICA”**

Resumen aprobado por:



---

**Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez**  
Co-Directora de tesis



---

**Dra. Ivone Giffard Mena**  
Co-Directora de tesis

El ostión *Crassostrea virginica* tiene gran importancia biológica y económica en el Golfo de México, región que es conocida por ser de alta extracción y producción de hidrocarburos. La exposición los moluscos bivalvos a los hidrocarburos puede afectar negativamente distintos procesos fisiológicos, entre estos el proceso reproductivo. En *C. virginica*, el efecto de los hidrocarburos en la gónada de organismos indiferenciados para evaluar el posible daño ocasionado durante el proceso de maduración reproductiva no ha sido evaluado. Para evaluar este posible daño, se realizó un análisis transcriptómico de gónadas de organismos indiferenciados de *C. virginica* expuestos a una concentración de 200 µg/L de hidrocarburos en distintos tiempos de exposición (7, 14 y 21 días) y un tratamiento control (sin hidrocarburos). El análisis transcriptómico de la gónada mostró un efecto negativo de la exposición a hidrocarburos con la sub-expresión de 22 genes involucrados en distintas etapas del proceso de maduración gonadal. Además, se observó una sub-expresión de genes del sistema inmune, lo que nos indica que la exposición a hidrocarburos causa inmunosupresión en los bivalvos. Un grupo de genes de respuesta a estrés oxidativo se sub-expresó también, los cuales pueden ser utilizados como biomarcadores asociados a contaminación por hidrocarburos en la gónada de *C. virginica*.

**Palabras clave:** Ostión americano, bivalvo, RNA-seq, hidrocarburos policíclicos aromáticos, hidrocarburos alifáticos, desarrollo gonadal, Laguna Madre, Golfo de México.

**ABSTRACT** of the thesis presented by **Sandra Tapia Morales** as a partial requirement to obtain the Doctor of Science degree in Molecular Ecology and Biotechnology with orientation in Marine Biotechnology.

**“EFFECT OF HYDROCARBONS IN THE GONADAL DEVELOPMENT OF  
*Crassostrea virginica*: TRANSCRIPTOMIC APPROACH”**

Abstract approved by:



---

**Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez**  
Thesis Director



---

**Dra. Ivone Giffard Mena**  
Thesis Director

The *Crassostrea virginica* oyster has biological and economic importance in the Gulf of Mexico, an area with a high extraction and production of hydrocarbons. Exposure to hydrocarbons affects the reproductive processes in bivalves. In *C. virginica*, the effect of hydrocarbons on the gonad of the undifferentiated organism has not been evaluated to determine the possible damage during the maturation process. To evaluate this effect, RNA-seq data was generated from *C. virginica* gonads exposed to a 200 µg/L of hydrocarbons at different exposure times (7, 14 and 21 days) and a control treatment (without hydrocarbons). The analysis of the gonad transcriptome showed the negative effect of hydrocarbons on maturation, with a sub-expression of 22 genes involved in different stages of this process. Additionally, genes in the immune system were down-regulated, which may indicate that exposure to hydrocarbons causes immunosuppression in bivalves. A group of oxidative stress genes was also reduced. These data contribute to a better understanding of the effect of hydrocarbons on the reproductive process in bivalves and, at the same time, allow us to identify possible biomarkers associated with hydrocarbon contamination in the gonad of *C. virginica*.

**Keywords:** Eastern oyster, bivalves, RNA-seq, polycyclic aromatic hydrocarbons, aliphatic hydrocarbons, gonadal development, Gulf of Mexico.

## **DEDICATORIA**

A mi mamá por ser un gran ejemplo de esfuerzo y superación, porque a pesar de todos los obstáculos siempre me ha dado su apoyo incondicional, por hacerme saber que siempre está ahí.

A mis hermanos, sobrinos, familiares, amigos y todas las personas que, a lo largo de este proceso me han ayudado a crecer como persona, que han sido un gran apoyo, que se han quedado en los momentos difíciles, y que han hecho más llevadero este proceso.

## **AGRADECIMIENTOS**

Esta investigación ha sido financiada por el Fondo Sectorial CONACyT-SENER-Hidrocarburos, proyecto 201441. Esta es una contribución del Consorcio de Investigación del Golfo de México (CIGoM).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado durante el periodo de estudios de Doctorado.

A la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), a la Facultad de Ciencias Marinas (FCM), y al Departamento de Biotecnología Marina del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE) por su ayuda en mi formación académica y por hacer posible la realización de este trabajo.

A Gerardo Amador Cano y Jacqueline Granados Covarrubias por el apoyo en los muestreos y en el desarrollo del experimento en la Universidad Tecnológica del Mar de Tamaulipas Bicentenario (UTMART).

A la Dra. Dalila Aldana Aranda y a la Dra. Martha Enríquez Diaz por la realización de los análisis histológicos en el laboratorio de histología en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) unidad Mérida. También al Dr. Marco Liñan Cabello por su ayuda en la observación de las laminillas histológicas para la evaluación de algún tipo de daño.

Al Dr. Edgar A. López Landavery y a la M. C. Ma. Dolores Camacho por su valioso apoyo desde el muestreo de organismos, hasta el análisis en laboratorio.

Al M. C. Ricardo Gómez Reyes por su gran ayuda en el análisis bioinformático de los datos de secuenciación obtenidos.

A los miembros del comité de tesis, Dr. Edgar López Landavery, Dra. Nancy Ramírez Álvarez y al Dr. Fernando Díaz Herrera por su valiosa ayuda en las distintas etapas de la realización de este trabajo.

A todo el equipo del laboratorio de Biotecnología Marina, a la Dra. Edna Sánchez y todos los compañeros de laboratorio que de alguna u otra manera han formado parte de este proceso (Lolis, Javi, Anaid, Manuel, Lau, Leo, Oscar, Blanca, Clara, Ricardo, Miguel, Silvia entre otros más).

A mi mamá, hermanos y amigos por estar ahí, por apoyarme, por creer siempre en mí.

Por último, a las Dras. Clara E. Galindo Sánchez e Ivone Giffard Mena ya que sin su apoyo y guía la culminación de este proceso no sería posible. Por permitirme participar en este proyecto y colaborar con este excelente equipo de trabajo, por los conocimientos transmitidos y por la paciencia durante todo este tiempo.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN .....	2
DEDICATORIA.....	4
AGRADECIMIENTOS .....	5
LISTA DE FIGURAS .....	11
LISTA DE TABLAS.....	14
1. INTRODUCCIÓN .....	17
1.1 Generalidades de <i>Crassostrea virginica</i> .....	17
1.2 Maduración gonadal de los moluscos bivalvos .....	19
1.2.1 Gametogénesis. ....	19
1.2.2 Factores exógenos que regulan la gametogénesis. ....	19
1.2.3 Factores endógenos que regulan la gametogénesis. ....	20
1.3 Expresión de genes relacionados con la gametogénesis en moluscos .....	21
1.4 Ciclo reproductivo de <i>Crassostrea virginica</i> .....	23
1.5 Importancia de <i>Crassostrea virginica</i> .....	24
1.5.1 Económica.....	24
1.5.2 Ecológica.....	25
1.6 El Golfo de México, zona de producción de hidrocarburos. ....	26
1.7 Definición de hidrocarburos .....	28
1.7.1 Clasificación de los hidrocarburos. ....	28
1.7.2 Toxicidad de los hidrocarburos en organismos marinos.....	29
1.8 Efecto de los hidrocarburos en bivalvos.....	29
1.9 Contaminantes en <i>Crassostrea virginica</i> .....	30
1.10 Hidrocarburos en <i>Crassostrea virginica</i> .....	31
2 JUSTIFICACIÓN.....	32



3	HIPÓTESIS .....	32
4	OBJETIVOS .....	33
4.1	Objetivo general .....	33
4.2	Objetivos específicos .....	33
5	MATERIALES Y MÉTODOS .....	34
5.1	Zona de muestreo .....	34
5.2	Captura y mantenimiento de <i>Crassostrea virginica</i> .....	35
5.3	Aclimatación de <i>Crassostrea virginica</i> en laboratorio.....	35
5.4	Exposición de <i>Crassostrea virginica</i> a hidrocarburos.....	35
5.5	Análisis de hidrocarburos .....	37
5.5.1	Extracción de hidrocarburos .....	37
5.5.2	Determinación de hidrocarburos alifáticos en tejido blando de <i>Crassostrea virginica</i> .....	38
5.5.3	Determinación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) en tejido blando de <i>Crassostrea virginica</i> .....	39
5.6	Análisis Histológico .....	40
5.6.1	Determinación de sexo en <i>Crassostrea virginica</i> .....	41
5.6.2	Determinación de desarrollo gonádico / estadio reproductivo. ....	42
5.7	Análisis transcriptómico de gónada de organismos indiferenciados de <i>Crassostrea virginica</i> .....	43
5.7.1	Extracción de RNA total de gónada.....	43
5.7.2	Preparación de bibliotecas y secuenciación masiva del RNA (RNA-Seq) .	43
5.7.3	Análisis bioinformático .....	44
5.8	Validación de los genes de maduración gonadal mediante qPCR.....	47
5.8.1	Síntesis de ADN complementario (cDNA) .....	47

5.8.2	Identificación de genes de referencia .....	47
5.8.3	Análisis de expresión génica cuantitativa mediante PCR en tiempo real ..	48
5.8.4	Estandarización de la amplificación de los genes de estudio por PCR punto final.	49
5.8.5	Estandarización de la eficiencia de los primers diseñados.....	50
5.8.6	Validación de genes de referencia para el análisis de muestras de gónada.	52
5.8.7	Análisis de expresión relativa de los genes ARSB, DDX5, FZD5, LIPR1, M3K7, P85A, STDB1 y TEMPT.....	52
5.9	Análisis estadísticos.....	52
5.9.1	Análisis de expresión diferencial mediante qPCR .....	53
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	54
6.1	Concentración de hidrocarburos en sedimento de la Laguna Morales, La Pesca, Soto La Marina Tamaulipas.....	54
6.2	Concentración de hidrocarburos en el tejido blando de <i>Crassostrea virginica</i> .	55
6.3	Análisis histológico de <i>C. virginica</i> para identificación de sexos y evaluación del efecto de los hidrocarburos en el tejido gonadal. ....	60
6.4	Análisis histológico cuantitativo.....	62
6.5	Análisis transcriptómico de organismos indiferenciados .....	65
6.5.1	Bibliotecas genómicas de organismos indiferenciados .....	65
6.5.2	Análisis transcriptómico .....	67
6.5.3	Efecto de los hidrocarburos sobre la transcripción de genes en la gónada de organismos indiferenciados. ....	69
6.6	Análisis de expresión de genes mediante PCR cuantitativo en tiempo real.....	87
6.6.1	Estandarización de genes de referencia .....	87
6.6.2	Estandarización de genes de interés.....	88

6.6.3	Análisis de curvas de eficiencia.....	90
6.6.4	Graficas de expresión de los genes de interés.....	91
7	CONCLUSIONES .....	93
8	LITERATURA CITADA.....	95
ANEXO 1. Genes con expresión diferencial no relacionados con la maduración gonadal. .....		109
ANEXO 2. Protocolo para síntesis de DNA complementario (cDNA) Kit ImProm-II Reverse Transcription System .....		117
ANEXO 3. Curvas de eficiencia de los genes de referencia. ....		119
ANEXO 4. Curvas de eficiencia de los genes de interés.....		122

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de las valvas de <i>Crassostrea virginica</i> . .....	17
Figura 2. Golfo de México. ....	26
Figura 3. Producción de barriles de petróleo del año 2000 al 2018. ....	27
Figura 4. Principales cuencas productoras de hidrocarburos en México. ....	28
Figura 5. Laguna Madre (La Pesca, Soto La Marina, Tamaulipas, México). ....	34
Figura 6. Unidades experimentales. ....	36
Figura 7. Análisis histológico del tejido gonádico de <i>C. virginica</i> . ....	41
Figura 8. Hidrocarburos detectados en el sedimento de la Laguna Madre .....	55
Figura 9. Hidrocarburos alifáticos detectados en el tejido blando de <i>C. virginica</i> . ....	57
Figura 10. Hidrocarburos policíclicos aromáticos detectados en el tejido blando de <i>C. virginica</i> . ....	58
Figura 11. Anillos en la estructura de los hidrocarburos policíclicos aromáticos identificados. ....	59
Figura 12. Estadios de madurez reproductiva de <i>C. virginica</i> . ....	60
Figura 13. Gónada de <i>C. virginica</i> . ....	61
Figura 14. Número de organismos por tratamiento y tiempo de muestreo. ....	65
Figura 15. RNA de las muestras a utilizar para realizar las librerías genómicas. ....	66
Figura 16. Bibliotecas genómicas de gónada de organismos indiferenciados de <i>C. virginica</i> . ....	67
Figura 17. Top 20 de los procesos identificados en el análisis transcriptómico de la gónada de organismos indiferenciados de <i>C. virginica</i> .....	69

Figura 18. Clasificación por ontología génica de los transcritos identificados en la gónada de organismos indiferenciados de <i>C. virginica</i> .....	69
Figura 19. Diagramas de Venn. ....	70
Figura 20. Heatmap del análisis de patrones de expresión .....	72
Figura 21. Categorías de ontología genética (GO) enriquecida de genes sub-expresados en la gónada de <i>C. virginica</i> en el T1 .....	73
Figura 22. Categorías de ontología genética (GO) enriquecida con genes sobre-expresados en la gónada de <i>C. virginica</i> en el T1 .....	74
Figura 23. Categorías de ontología genética (GO) enriquecida con genes sub-expresados en la gónada de <i>C. virginica</i> en el T2. ....	75
Figura 24. Categorías de ontología genética (GO) enriquecida con genes sobre-expresados en la gónada de <i>C. virginica</i> en el T2 .....	76
Figura 25. Categorías de ontología genética (GO) enriquecida con genes sub-expresados en la gónada de <i>C. virginica</i> en el T3. ....	77
Figura 26. Categorías de ontología genética (GO) enriquecida con genes sub-expresados en la gónada de <i>C. virginica</i> en el T3 .....	77
Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa del gradiente de temperaturas para estandarizar los genes de referencia seleccionados.....	87
Figura 28. Genes de interés estandarizados por PCR punto final. ....	89
Figura 29. Análisis de expresión diferencial de los genes de interés. ....	92
Figura 37. Curva de eficiencia del gen KS6A1 .....	119
Figura 38. Curva de eficiencia del gen NATD1. ....	119
Figura 39. Curva de eficiencia del gen RPL19 .....	120

Figura 40. Curva de eficiencia del gen RPS24.....	120
Figura 41. Curva de eficiencia del gen TSPO. ....	121
Figura 42. Curva de eficiencia del gen UBP37.....	121
Figura 43. Curva de eficiencia del gen ARSB. ....	122
Figura 44. Curva de eficiencia del gen DDX5 .....	122
Figura 45. Curva de eficiencia del gen FZD5.....	123
Figura 46. Curva de eficiencia del gen LIPR1.....	123
Figura 47. Curva de eficiencia del gen M3K7.....	124
Figura 48. Curva de eficiencia del gen P85A. ....	124
Figura 49. Curva de eficiencia del gen STDB1. ....	125
Figura 50. Curva de eficiencia del gen TEMPT.....	125

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Primers específicos para genes de referencia identificados en el transcriptoma de <i>Crassostrea virginica</i> .....	47
Tabla 2. Primers específicos para genes relacionados con la maduración gonadal de <i>C. virginica</i> .....	48
Tabla 3. Mezcla de reacción. ....	50
Tabla 4. Condiciones de PCR para estandarizar primers. ....	50
Tabla 5. Master mix 2x Eva Green – Accustart taq.....	51
Tabla 6. Condiciones de amplificación para PCR en tiempo real.....	51
Tabla 7. Lecturas pre-procesadas (mapeadas contra <i>C. virginica</i> , PhiX y Univec).....	68
Tabla 8. Genes y proteínas relacionados con la maduración gonadal de <i>C. virginica</i> ..	81
Tabla 9. Resumen del efecto de hidrocarburos en la gónada de <i>C. virginica</i> . ....	86
Tabla 10. Valores de las curvas de eficiencia de los genes de referencia .....	90
Tabla 11. Valores de las curvas de eficiencia de los genes de interés .....	90
Tabla 12. Genes del sistema inmune con expresión diferencial respecto al control en la gónada de <i>C. virginica</i> expuesto a 200 µg/L de hidrocarburos en T1 (7días), T2 (14 días) y T3 (21 días).....	109
Tabla 13. Genes de estrés oxidativo con expresión diferencial respecto al control en la gónada de <i>C. virginica</i> expuesto a 200 µg/L de hidrocarburos en T1 (7días), T2 (14 días) y T3 (21 días).....	110
Tabla 14. Genes de proteínas chaperonas con expresión diferencial respecto al control en la gónada de <i>C. virginica</i> expuesto a 200 µg/L de hidrocarburos en T1 (7días), T2 (14 días) y T3 (21 días).....	110

Tabla 15. Genes de proteínas ribosomales con expresión diferencial respecto al control en la gónada de <i>C. virginica</i> expuesto a 200 µg/L de hidrocarburos en T1 (7días), T2 (14 días) y T3 (21 días).....	111
Tabla 16. Genes de metabolismo de ácidos nucleicos con expresión diferencial respecto al control en la gónada de <i>C. virginica</i> expuesto a 200 µg/L de hidrocarburos en T1 (7días), T2 (14 días) y T3 (21 días).....	111
Tabla 17. Genes de metabolismo de aminoácidos con expresión diferencial respecto al control en la gónada de <i>C. virginica</i> expuesto a 200 µg/L de hidrocarburos en T1 (7días), T2 (14 días) y T3 (21 días).....	112
Tabla 18. Genes de metabolismo de proteínas con expresión diferencial respecto al control en la gónada de <i>C. virginica</i> expuesto a 200 µg/L de hidrocarburos en T1 (7días), T2 (14 días) y T3 (21 días).....	112
Tabla 19. Genes de metabolismo de vitaminas con expresión diferencial respecto al control en la gónada de <i>C. virginica</i> expuesto a 200 µg/L de hidrocarburos en T1 (7días), T2 (14 días) y T3 (21 días).....	113
Tabla 20. Genes de metabolismo de lípidos con expresión diferencial respecto al control en la gónada de <i>C. virginica</i> expuesto a 200 µg/L de hidrocarburos en T1 (7días), T2 (14 días) y T3 (21 días).....	113
Tabla 21. Genes de metabolismo de carbohidratos con expresión diferencial respecto al control en la gónada de <i>C. virginica</i> expuesto a 200 µg/L de hidrocarburos en T1 (7días), T2 (14 días) y T3 (21 días).....	113



Tabla 22. Genes de componente celular con expresión diferencial respecto al control en la gónada de <i>C. virginica</i> expuesto a 200 µg/L de hidrocarburos en T1 (7días), T2 (14 días) y T3 (21 días). .....	114
Tabla 23. Genes de adhesión celular con expresión diferencial respecto al control en la gónada de <i>C. virginica</i> expuesto a 200 µg/L de hidrocarburos en T1 (7días), T2 (14 días) y T3 (21 días). .....	114
Tabla 24. Genes de diferenciación celular con expresión diferencial respecto al control en la gónada de <i>C. virginica</i> expuesto a 200 µg/L de hidrocarburos en T1 (7días), T2 (14 días) y T3 (21 días). .....	115
Tabla 25. Genes de transporte celular con expresión diferencial respecto al control en la gónada de <i>C. virginica</i> expuesto a 200 µg/L de hidrocarburos en T1 (7días), T2 (14 días) y T3 (21 días). .....	115
Tabla 26. Genes de la cadena respiratoria con expresión diferencial respecto al control en la gónada de <i>C. virginica</i> expuesto a 200 µg/L de hidrocarburos en T1 (7días), T2 (14 días) y T3 (21 días). .....	115
Tabla 27. Otros genes con expresión diferencial con respecto al control en la gónada de <i>C. virginica</i> expuesto a 200 µg/L de hidrocarburos en T1 (7días), T2 (14 días) y T3 (21 días). .....	116

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Generalidades de *Crassostrea virginica*

La ostra *Crassostrea virginica*, pertenece a la clase Bivalvia, dentro de la cual se engloban todos los moluscos que se encuentran encerrados en dos conchas o valvas (Gosling, 2008). Las valvas son secretadas por el manto y están unidas por la charnela, dos músculos aductores controlan al apertura y cierre de estas, dentro de las valvas se encuentra los órganos del bivalvo (Gosling, 2008). Las valvas presentan diferencias morfológicas, la derecha es plana mientras que la izquierda es cóncava (Fig. 1), esta última es la que se encuentra cementada al sustrato. Pueden alcanzar tallas de hasta 350 mm (Gosling, 2008).



**Figura 1. Morfología de las valvas de *Crassostrea virginica***  
([https://run.unl.pt/bitstream/10362/20470/1/Magro\\_2016.pdf](https://run.unl.pt/bitstream/10362/20470/1/Magro_2016.pdf)).

Algunos bivalvos, como *C. virginica* viven permanentemente adheridos a algún sustrato, esta unión la hacen mediante una sustancia cementante que fija la valva izquierda a la superficie (Gosling, 2008).

*C. virginica* presenta una amplia distribución, desde el Golfo de St. Lawrence en Canadá, Golfo de México y se extiende hasta las costas de Brasil y Argentina, una distancia total de 8000 km (Gosling, 2008). En las costas mexicanas se encuentra principalmente en los estados de Campeche, Tabasco, Veracruz y Tamaulipas (Baqueriro-Cárdenas and Aldana-Aranda, 2007), siendo todas estas regiones zonas de extracción y producción de hidrocarburos (Joye et al., 2016).

En el presente trabajo se utilizaron organismos de la Laguna Morales, ubicada en el municipio de Soto La Marina en Tamaulipas. Laguna Morales tiene una salinidad de 34.5 y un pH de 6.1 (García-Soriano et al., 2009). Se encuentra ubicada en la zona sur del complejo lagunar de la Laguna Madre, la cual está considerada como Área Natural Protegida (CONANP, 2015), y además está certificada por el Programa Mexicano de Sanidad de Moluscos Bivalvos (PMSMB), como una zona de cosecha de ostión apta para consumo humano (Barreiro Isabel et al., 2016).

Un aspecto importante a considerar para el estudio de los moluscos bivalvos es la maduración reproductiva, ya que de esta dependerá el éxito de las poblaciones. Siendo este proceso afectado directamente por contaminantes, dentro de los principales se encuentran los hidrocarburos (Tuvikene, 2016).

## **1.2 Maduración gonadal de los moluscos bivalvos**

### **1.2.1 Gametogénesis.**

La gametogénesis es el evento central relacionado con la maduración gonadal, e incluye la ovogénesis en hembras y espermatogénesis en machos. El inicio de este proceso depende de estímulos externos o ambientales (temperatura, fotoperiodo, disponibilidad de alimento, feromonas, etc.) los cuales influirán en la estimulación y activación de factores y/o moléculas internos (genes y/o factores nutricionales involucrados en la recepción/transducción de señales, moléculas activadoras del almacenamiento y movilización de reservas energéticas, etc.) que resultan en la formación de gametos, diferenciación y maduración (Agulleiro-Gozalbo, 2007).

### **1.2.2 Factores exógenos que regulan la gametogénesis.**

#### *1.2.2.1 Factores Naturales*

Diversos factores ambientales suelen influir sobre la gametogénesis de los moluscos bivalvos, entre estos están la temperatura, disponibilidad de alimento, fotoperiodo, salinidad, etc. De estos, la temperatura es el factor que se cita de manera individual como el principal detonante de la gametogénesis en bivalvos (Gosling, 2008).

#### *1.2.2.2 Factores Antropogénicos*

Los factores antropogénicos pueden interferir con el desarrollo gametogénico en el medio natural y afectar la reproducción de organismos de importancia económica. Aguilar

et al. (2012) mencionan que los contaminantes en el medio marino pueden alterar el comportamiento de los organismos, alterar la fisiología o demostrar tolerancia o intolerancia a estos.

Dentro de los principales contaminantes que afectan el medio marino se encuentran los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs), los cuales pueden tener efectos negativos en la reproducción de algunos organismos marinos. Ocasionando disrupción en la síntesis de hormonas esteroideas, las cuales están involucradas en el inicio de la maduración gonadal.

### **1.2.3 Factores endógenos que regulan la gametogénesis.**

Los diversos factores exógenos mencionados anteriormente, actúan sobre el sistema nervioso de los moluscos bivalvos, a través de receptores sensoriales en los ganglios nerviosos (Gosling, 2008) estimulando los diversos factores endógenos que regularan la maduración gonadal. El ganglio nervioso estimulado, secretará neurohormonas las cuales tendrán un efecto fisiológico sobre la gónada. La actividad de las células neurosecretoras es baja durante el periodo de reposo gonadal, aumentando hasta alcanzar el máximo de actividad antes del desove (Gosling, 2008).

En *Argopecten irradians* se han identificado cinco etapas neurosecretoras relacionadas con el ciclo reproductivo (Gosling, 2008), pero podrían aplicar para el resto de los bivalvos:

**Etapa I:** Neurosecreciones que permiten la acumulación de nutrientes.

**Etapas II y III:** Neurosecreciones que actúan como “interruptor” (encendido-apagado) de la transferencia de nutrientes hacia la gónada.

**Etapas IV:** Neurosecreciones de crecimiento y maduración de ovocitos.

**Etapas V:** Neurosecreciones que dan inicio al desove.

### **1.3 Expresión de genes relacionados con la gametogénesis en moluscos**

La hormona liberadora de gonatropinas (GnRH) estimula la síntesis y liberación de esteroides sexuales en gónadas en el pulpo *Octopus vulgaris* (Minakata et al., 2009). En la gónada *Crassostrea gigas* (Rodet et al., 2005) se identificó un receptor ortólogo de la GnRH, el cual presenta un alto grado de similitud en la secuencia de aminoácidos con los receptores de GnRH de vertebrados. Song et al. (2015) identificaron la secuencia de cDNA de la prepro-GnRH en el ganglio visceral de la almeja *Ruditapes philippinarum*.

Matus De la Parra et al. (2005) determinaron que el glucógeno es la principal reserva energética en *Crassostrea gigas*. El contenido de glucógeno en los tejidos depende de dos enzimas, la glucógeno sintetasa y la glucógeno fosforilasa, encargadas del uso y almacenamiento del glucógeno (Bacca et al., 2005; Fabbri and Capuzzo, 2010).

Bacca et al. (2005) reportaron el transcrito de la glucógeno sintetasa y fosforilasa en diferentes tejidos de *Crassostrea gigas* y durante distintos estadios de madurez reproductiva. Observándose una alta expresión de los genes de estas enzimas en palpos labiales y gónada, y un comportamiento relacionado con el ciclo reproductivo. Durante el

periodo de reposo gonadal se observó una alta expresión de la glucógeno sintetasa, lo que corresponde con el almacenamiento de glucógeno en *C. gigas* (Bacca et al., 2005). En cambio, los niveles relativos de la glucógeno fosforilasa fueron mayores en la etapa de movilización de glucógeno para la maduración de la gónada (Bacca et al., 2005).

El gen vasa-like, tiene una función importante en el desarrollo de las células germinales tanto de machos como de hembras y ha sido identificado en la gónada de organismos adultos de *C. gigas*, observándose su expresión en las células auxiliares (foliculares) que rodean a los ovocitos (Fabioux et al., 2004).

La asparto transcarbimalasa es una enzima clave involucrada en la síntesis de las bases pirimidínicas, las cuales son componentes esenciales de los ácidos nucleicos. Esta enzima se ha correlacionado con estadios de la gametogénesis, y se ha mencionado que es un buen índice del ciclo reproductivo en los moluscos marinos (Etchian and Pellerin, 2003), ya que su mayor actividad se observaría en las etapas iniciales. Algunos de estos moluscos son *Pecten maximus* (Bergeron and Alayse-Danet, 1981), *Mytilus edulis* (Mathieu, 1987), y *Mya arenaria* (Etchian et al., 2004).

En *Crassostrea gigas* se determinó que el mRNA del receptor de estrógenos se expresa en varios tejidos. Los que presentan una mayor expresión de este receptor son gónada, palpos labiales y branquias, en contraste el manto y la glándula digestiva lo expresan muy poco (Matsumoto et al., 2007).

Matsumoto et al. (2003) determinaron que la vitelogenina se expresa únicamente en el ovario, específicamente en las células foliculares en el caso de *Crassostrea gigas* y del abulón *Haliotis discus hannai* (Awaji et al., 2011).

Los genes mencionados anteriormente son de los principales reportados para moluscos bivalvos relacionados con la madurez reproductiva.

#### **1.4 Ciclo reproductivo de *Crassostrea virginica***

Dentro de los aspectos estudiados en *C. virginica* se encuentran las etapas del ciclo de maduración gonadal, las cuales dependen de las condiciones ambientales. Hayes y Menzel (1981) en su estudio sobre el ciclo reproductivo de *C. virginica* en el norte del Golfo de México mencionan que el estado de madurez de la gónada depende en gran parte de la temperatura del agua.

Aldana-Aranda et al. (2014) observaron que la temperatura se correlaciona positivamente con la gametogénesis y la madurez con la clorofila total, mientras que el desove se correlaciona negativamente con la salinidad. Las etapas de madurez varían de estacionales unos meses a continuas el resto del año (Aldana-Aranda et al., 2014). Aldana-Aranda et al. (2014) reportan que en lagunas en donde hay bajos niveles de clorofila total, el estadio de reposo o la recuperación de la gónada es más lenta que en zonas con alto contenido de nutrientes.

En la Laguna de Tamiahua en el norte de Veracruz se han observado organismos de *C. virginica* maduros todo el año, presentando un mayor pico (hembras 54 – 66 % y machos 55 – 80 %) en el mes de agosto (Ascencio-Aguirre et al., 2016). Para esta misma zona Ascencio-Aguirre et al. (2016) mencionan que en las hembras la madurez se correlaciona positivamente con la temperatura sin importar la talla del organismo. En el caso de los machos cuya talla sea  $\geq 61$  mm el desove estará correlacionado positivamente con la salinidad (Ascencio-Aguirre et al., 2016). El desove en organismos



con una talla entre 40 – 60 mm no presenta correlación alguna en ambos sexos (Ascencio-Aguirre et al., 2016).

Los bivalvos que habitan en zonas tropicales presentan una estrategia reproductiva continua y asincrónica, con organismos produciendo gametos y desovando durante cada mes del año (Freites et al., 2010). En donde las especies tienen una estrategia oportunista para regenerar sus gónadas, tomando la energía del alimento disponible del medio y rara vez de las reservas almacenadas en el tejido somático (Freites et al., 2010).

Las hembras de *C. virginica* pueden producir entre 3.7 a 65.4 millones de óvulos, lo cual está directamente relacionado con el tamaño del organismo (Choi et al., 1993).

## **1.5 Importancia de *Crassostrea virginica***

### **1.5.1 Económica**

*C. virginica* se encuentra dentro de un grupo de moluscos de gran importancia económica en México. El ostión en general, por volumen de captura se ha posicionado en el lugar 5 de la producción pesquera en México (CONAPESCA, 2014). En el 2014 se extrajeron en México 53,757 toneladas de ostión, siendo el 84 % de esta producción del Golfo de México (CONAPESCA, 2014).

En el Golfo de México la pesquería de *C. virginica* es la principal actividad productiva. Los principales estados productores de *C. virginica* son Veracruz con el 48%, Tabasco con el 46% y Tamaulipas con el 6% (CONAPESCA, 2014). De la producción pesquera total de Tamaulipas en el 2014, el ostión fue el 7%, con 2736 toneladas (CONAPESCA, 2014).

Es la única especie de molusco que tiene una pesquería establecida y regulada en el complejo lagunar de la Laguna Madre (Tamaulipas), a pesar de que su captura ha decaído debido a la sobreexplotación (CONANP, 2015). La captura de ostras nativas en el Golfo de México es la más alta a nivel mundial, a pesar de la disminución de su abundancia y arrecifes en algunas bahías (Beck et al., 2011). *Crassostrea virginica* tiene una talla mínima de captura de 80 mm (Aldana-Aranda et al., 2014). El tiempo en alcanzar esta talla puede ser de entre uno a tres años, esto dependerá de la temperatura, salinidad y disponibilidad de alimento de la zona (Sarinsky et al., 2005).

### 1.5.2 Ecológica

Los arrecifes formados por las ostras desempeñan un papel ecológicamente importante, proporcionan un hábitat para el desarrollo y resguardo de distintas especies de peces e invertebrados (camarones, cangrejos, etc.) (Abeels et al., 2012; Nestlerode et al., 2007). Sin embargo estos ambientes se encuentran en peligro, y se considera que la pesquería de *C. virginica* en el Golfo de México es probablemente la última oportunidad para lograr la conservación a gran escala de los arrecifes de ostras y la pesca sustentable (Beck et al., 2011).

El ostión *C. virginica* se distribuye en las lagunas costeras del Golfo de México (Fig. 2), zona que es conocida por ser de alta extracción y producción de hidrocarburos, por lo que puede ocurrir filtración natural de estos compuestos, así como grandes derrames, exponiendo al medio marino de manera breve o frecuente a estos compuestos (Joye et al., 2016). Lo anterior ha generado la necesidad de estudiar el efecto que los

hidrocarburos pueden tener en distintos procesos fisiológicos de *Crassostrea virginica*, los cuales podrían afectar a las comunidades en el medio natural.

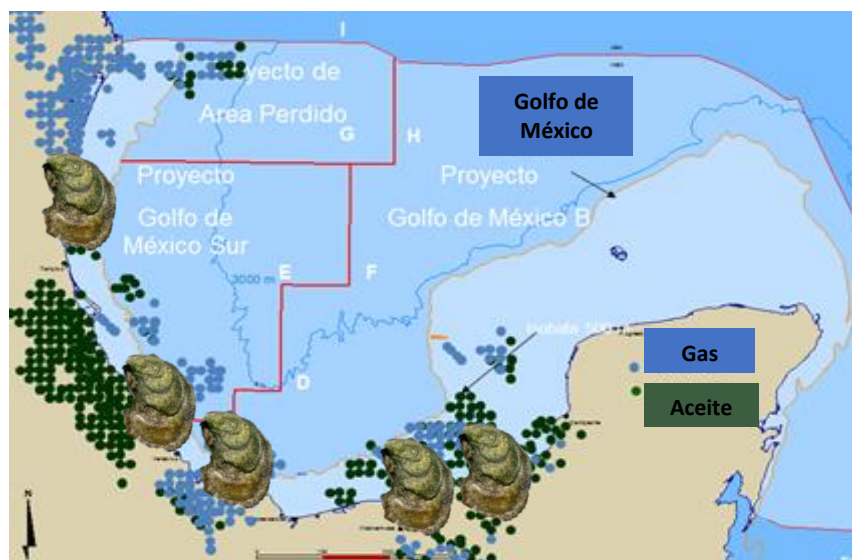


Figura 2. Golfo de México, zona de distribución de *Crassostrea virginica* y de producción de hidrocarburos (<https://sites.google.com/site/economiaoilmexico/to-dos>).

## 1.6 El Golfo de México, zona de producción de hidrocarburos.

El Golfo de México es una de las zonas petroleras más grandes del mundo, siendo México uno de los principales productores y exportadores de hidrocarburos para Latinoamérica, Estados Unidos, Canadá, Europa y Asia (Botello et al., 2005). En la figura 3 se observa la producción en miles de barriles diarios de petróleo crudo de los principales estados productores del Golfo de México (Tabasco, Veracruz y Tamaulipas), la producción por año de las aguas territoriales, así como la producción total de petróleo crudo en México del año 2000 a la fecha.

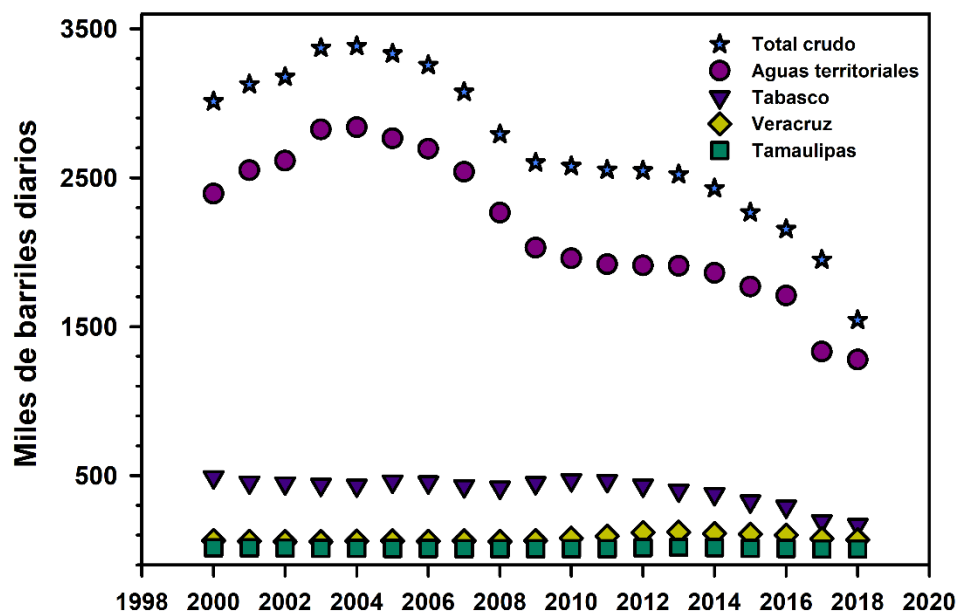


Figura 3. Producción de barriles de petróleo del año 2000 al 2018. Figura generada con datos de la página del Sistema de Información Energética (SIE) con información de Petróleos Mexicanos (PEMEX, <http://sie.energia.gob.mx/bdiController.do?action=cuadro&subAction=applyOptions>)

El Golfo de México también es considerado como la mayor área de perforaciones en la plataforma continental en el mundo (Botello et al., 2005). En la figura 4 se muestran las principales cuencas petroleras en México, las cuales son: Sabinas, Burgos, Tampico-Misantla, Veracruz, Sureste, Golfo de México Profundo y Plataforma de Yucatán (PEMEX, 2010). Para el año 2012 México contaba con 232 plataformas marinas, 9476 pozos de explotación y 449 campos de producción (PEMEX, 2013). La contaminación de las costas del Golfo por hidrocarburos es un problema de gran importancia ecológica en la actualidad (Botello et al., 2005).

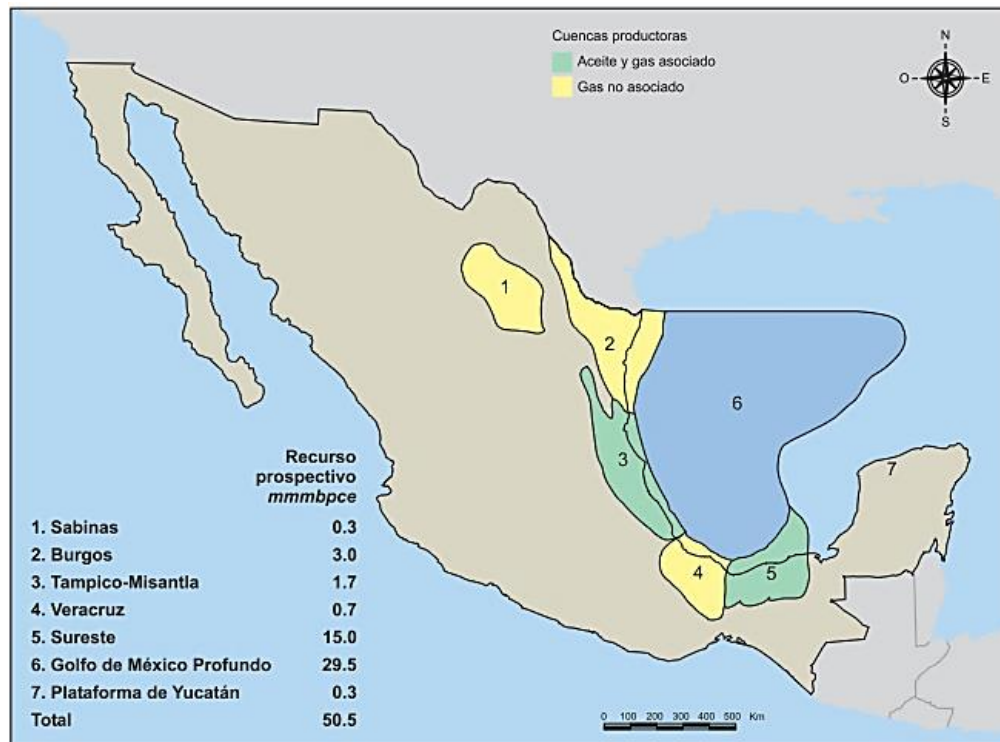


Figura 4. Principales cuencas productoras de hidrocarburos en México (PEMEX, 2010).

## 1.7 Definición de hidrocarburos

### 1.7.1 Clasificación de los hidrocarburos.

Distintos compuestos constituyen los hidrocarburos, los cuales se clasifican de acuerdo a su volatilidad que depende a su vez del punto de ebullición (Noriega-Espíndola, 2009). Dentro de los hidrocarburos se encuentran los de tipo biogénico y los diagenéticos (Botello et al., 2005). Los biogénicos son los sintetizados por la biota, en el medio marino son el plancton, algas bentónicas y otros organismos. Los diagenéticos provienen de una transformación microbiana o química que ocurre en los sedimentos,

dentro de este grupo se encuentran los hidrocarburos alifáticos y los policíclicos aromáticos (PAHs) (Botello et al., 2005).

De los dos tipos de hidrocarburos mencionados anteriormente, los PAHs son los más peligrosos para los organismos en el medio marino. Los PAHs son los primeros en incorporarse a los sedimentos, presentan baja hidrosolubilidad, vida media de 1 semana a 2 meses en ambientes marinos y de 8 meses a 6 años en sedimentos (Carmona-Uriostegui, 2015).

### **1.7.2 Toxicidad de los hidrocarburos en organismos marinos.**

En el caso de los peces algunos efectos negativos de los PAHs son el retraso de la gametogénesis, disminución del tamaño de la gónada y baja producción de células reproductivas (Tuvikene, 2016). Otro efecto negativo de los PAHs en peces se da en el metabolismo de lípidos, ocasionando que la energía disponible para la maduración se reduzca (Tuvikene, 2016).

## **1.8 Efecto de los hidrocarburos en bivalvos**

Respecto al efecto de los hidrocarburos en moluscos bivalvos se han realizado distintos experimentos. En el mejillón *Mytilus edulis* se observó que en lugares contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos entre otros contaminantes, los organismos crecen menos tanto en longitud total de la concha como en peso de tejido somático que en zonas menos contaminadas (Krishnakumar et al., 1995).

En el ostión japonés *Crassostrea gigas* (Jeong and Cho, 2005) se evidenció que la exposición a los PAHs tiene un efecto negativo en la fertilización (afectando la movilidad del espermatozoides principalmente) y el desarrollo larval.

Frouin et al. (2007) observaron un retraso en la gametogénesis de la almeja *Mya arenaria* al ser expuesta a una dieta con PAHs, también determinaron que los machos son más sensibles que las hembras a estos hidrocarburos y que provocaron una disfunción en la síntesis de esteroides sexuales.

En la escalopa *Chlamys farrery* se ha estudiado el efecto del benzopireno, un hidrocarburo policíclico aromático. Se observó que al exponer a los organismos a este PAH se suprimió en gran parte la producción de testosterona y de  $17\beta$ -estradiol, y fue disruptor de los niveles de progesterona en la gónada (Tian et al., 2013).

## **1.9 Contaminantes en *Crassostrea virginica***

Se han llevado a cabo estudios sobre el efecto de contaminantes en *C. virginica*. Aguilar et al. (2012) determinaron los niveles de metales pesados en este ostión de la Laguna de Términos (Campeche, México), evidenciando que el cobre y el cromo tienen un efecto directo en la disminución del índice de condición. El índice de condición es un indicador de la salud fisiológica del organismo (Chávez-Villalba et al., 2008), está relacionado directamente con la absorción de nutrientes del organismo lo cual depende de la disponibilidad de alimento.

Es importante el estudio del efecto de los contaminantes sobre los organismos que están expuestos a estos, debido a que cada uno presenta una respuesta diferente ante ellos (modificación en el comportamiento, tolerancia e intolerancia al contaminante y efectos sobre la fisiología) (Aguilar et al., 2012).

### **1.10 Hidrocarburos en *Crassostrea virginica***

Chu et al. (2002) determinaron la acumulación de PAH's en *C. virginica* al ser expuesto a sedimentos contaminados, observando que los organismos expuestos a una mayor cantidad de sedimentos (2 g) acumulaban concentraciones significativamente más altas de hidrocarburos que los de menor cantidad (1 y 1.5 g). Además la concentración fue mayor después de 20 y 40 días que después de 5 y 10 días (Chu et al., 2002).

A nivel transcriptómico Jenny et al. (2016) realizó un trabajo en donde se identificaron biomarcadores de estrés por la exposición a hidrocarburos en branquia y glándula digestiva de *C. virginica*.

Hasta ahora no se ha realizado un análisis transcriptómico del efecto que puede tener sobre la gametogénesis de *Crassostrea virginica* el estar expuesto a los hidrocarburos. Se han realizado estudios sobre la acumulación y el tiempo de eliminación de los PAHs en este bivalvo (Stegeman and Teal, 1973) pero no se ha profundizado sobre su efecto. En base a los estudios previos se puede decir que los PAHs podrían ser un disruptor de la esteroidogénesis y que podría afectar negativamente la reproducción, pero no se han estudiado las rutas que estarían siendo afectadas por los PAHs.



## 2 JUSTIFICACIÓN

Debido a la importancia que tiene *Crassostrea virginica* como recurso económico y ecológico y al efecto negativo que se sabe que los hidrocarburos pueden tener sobre la madurez reproductiva de los bivalvos es importante conocer el efecto sobre los procesos que estos compuestos inducen durante su desarrollo gonadal.

## 3 HIPÓTESIS

- Los hidrocarburos pueden ser altamente acumulables en el tejido blando de *Crassostrea virginica*.
- Altas concentraciones de hidrocarburos pueden ocasionar lesiones a nivel histológico en el tejido gonadal de *Crassostrea virginica*.
- Altas concentraciones de hidrocarburos afectaran la esteroidogénesis de *Crassostrea virginica*, y retardaran la gametogénesis.
- Altas concentraciones de hidrocarburos pueden inhibir la expresión de genes relacionados con el desarrollo gonadal y el sistema inmune, e inducir la expresión de genes de detoxificación.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de una mezcla de hidrocarburos (alifáticos y policíclicos aromáticos) en el tejido gonadal de juveniles del ostión *Crassostrea virginica*, así como en la maduración de la gónada y expresión de genes involucrados en este proceso.

### 4.2 Objetivos específicos

Determinar el nivel de acumulación de hidrocarburos en tejido blando a través del tiempo.

Evidenciar el efecto ocasionado por la exposición a hidrocarburos en el tejido gonadal a nivel histológico.

Identificar genes relacionados con la maduración gonadal con expresión diferencial en *Crassostrea virginica* al ser expuesto a una mezcla ligera de hidrocarburos.

Evaluar los niveles de expresión de genes relacionados con la maduración gonadal de ostión expuesto a una mezcla ligera de hidrocarburos a través del tiempo.

## 5 MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Zona de muestreo

Los juveniles de *Crassostrea virginica* utilizados en el experimento fueron obtenidos de la Laguna Madre (La Pesca, Soto La Marina, Tamaulipas, México, 23°46'05"N, 98°12'27"W) (Fig. 5).

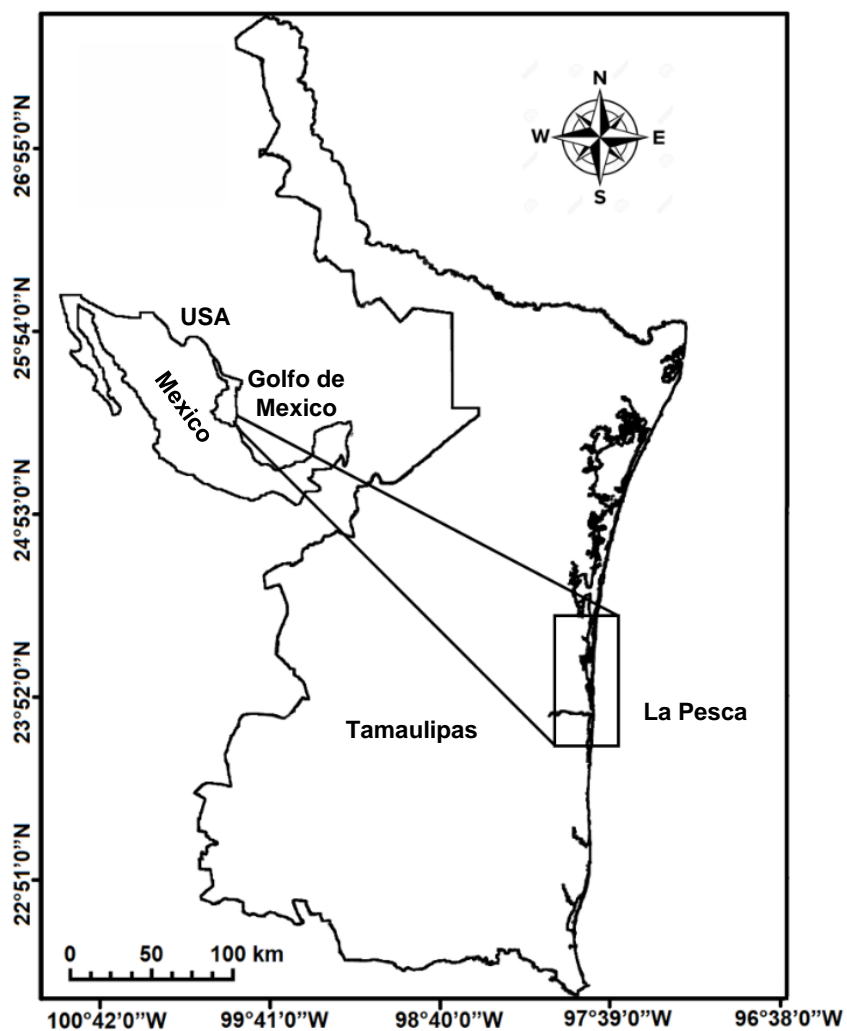


Figura 5. Laguna Madre (La Pesca, Soto La Marina, Tamaulipas, México).

## **5.2 Captura y mantenimiento de *Crassostrea virginica***

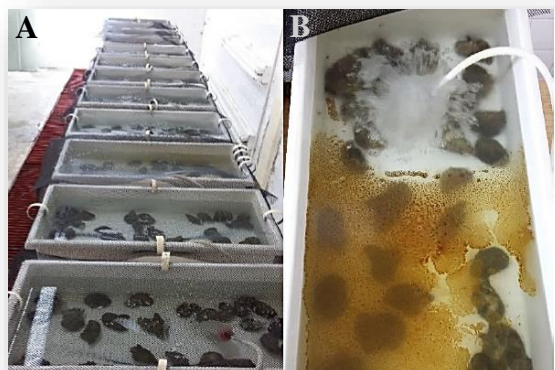
Se colectaron un total de 500 ostiones en tres puntos de muestreo. La longitud de concha de los organismos estuvo entre 49 y 60 mm. Los ostiones se mantuvieron a una temperatura de  $21\pm 1^{\circ}\text{C}$  y 19 g/L de salinidad hasta su traslado al laboratorio de producción de semilla de la Universidad Tecnológica del Mar de Tamaulipas Bicentenario (UTMART). Para la determinación de hidrocarburos en la laguna se colectó tejido blando de 20 ostiones y 100 g de sedimento.

## **5.3 Aclimatación de *Crassostrea virginica* en laboratorio**

Al llegar al laboratorio de producción de semilla de la UTMART, los ostiones fueron distribuidos en dos tanques rectangulares de 250 L (250 ostiones/tanque) con aireación constante en donde permanecieron durante dos semanas para su aclimatación. El recambio de agua se realizó diariamente y se incrementó la salinidad a razón de 3 g/L/día, hasta alcanzar los 33 g/L.

## **5.4 Exposición de *Crassostrea virginica* a hidrocarburos**

Se estableció un diseño completamente aleatorio, el cual consistió en un tratamiento control (sin hidrocarburos) y dos tratamientos experimentales con diferentes concentraciones de exposición a hidrocarburos (50 y 200  $\mu\text{g/L}$ ) (Fig. 6).



**Figura 6. A) Unidades experimentales y B) Adición de hidrocarburos a las unidades experimentales.**

La mezcla de hidrocarburos fue homogenizada en agua de mar a 200 rpm durante 24h y una tasa de carga de 0.1 g/L, tal como fue reportado por Singer et al. (2000). La mezcla homogenizada de hidrocarburos fue adicionada en las unidades experimentales desde el inicio del experimento y después de cada recambio de agua. Los recambios de agua se realizaron cada dos días y se reemplazó el 50 % del volumen total.

Durante el experimento, los organismos fueron alimentados con concentrado de la microalga *Isochrysis galbana* T-Iso (4-7  $\mu$ M, 3-4 x 10<sup>9</sup> células/mL, Isochrysis 1800™, Reed Mariculture). La ración diaria fue calculada con base en el peso seco de los ostiones (6%) y los horarios de alimentación fueron a las 08:00 y 16:00 h. El fotoperiodo al que se expusieron los organismos fue 12h:12h (luz: oscuridad).

Los tratamientos experimentales consistieron en una exposición a hidrocarburos durante 21 días. Se tomaron muestras a los 7, 14 y 21 días (para determinación de concentración de hidrocarburos, análisis histológico y extracción de RNA). Cada tratamiento incluyó tres réplicas biológicas con un tamaño de muestra igual a 81 (n=81).

## 5.5 Análisis de hidrocarburos

La mezcla de hidrocarburos que se utilizó fue proporcionada por Petróleos Mexicanos (PEMEX, 35 American Petroleum Institute gravity o 35° API, densidad de 0.83-0.87 g/cm<sup>3</sup>) y fue homogenizada como se describió previamente.

El método utilizado para la determinación de hidrocarburos en tejido blando de *C. virginica* (el tejido blando corresponde a todo el organismo) fue el descrito por Murphy et al. (2012), con algunas modificaciones.

### 5.5.1 Extracción de hidrocarburos

Se utilizaron 15 organismos por tratamiento (n=15), los cuales se procesaron en conjunto para la extracción de hidrocarburos. La extracción de hidrocarburos a partir del tejido blando se realizó en un Sistema de Extractor de Solventes Acelerado Dionex ASE 350 equipado con celdas de acero inoxidable de 34 mL totalmente activadas, empacadas secuencialmente con un filtro GF/F, 5 g de florisil, 6 g de alúmina básica. Los 1.5 g de homogenizado obtenidos de los 15 organismos fueron agregados a una capa de arena blanca y 3 g de tierra de diatomeas. Los 1.5 g de homogenizado fueron agregados a una capa de arena blanca y 3 g de tierra de diatomeas. El espacio vacío remanente en la celda fue rellenado con arena blanca (limpiada a 400 °C durante 4 horas). Finalmente, se adicionaron los estándares surrogados. Los estándares subrogados utilizados para los n-alcenos fueron el n-eicoseno y para los hidrocarburos aromáticos polinucleares se utilizó una mezcla de PAHs deuterados (naftaleno-d<sub>8</sub>, acenafteno-d<sub>10</sub>, antraceno-d<sub>10</sub>, criceno-d<sub>12</sub> y perileno-d<sub>12</sub>). El método de extracción consistió en cuatro ciclos estáticos de 5 min a 100 °C a presión constante de 1500 psi, con un volumen de recambio del 60%

de la capacidad de la celda y empleando diclorometano como solvente de extracción. Los extractos obtenidos fueron evaporados mediante un evaporador Rocket, posteriormente fueron transferidos a tubos de concentración y evaporados bajo flujo de nitrógeno hasta casi sequedad. El extracto fue llevado a un volumen de 1 mL con hexano.

La limpieza del extracto se realizó mediante cromatografía líquida por columna. Proceso que consiste en pasar el extracto a través de una columna (jeringa de vidrio de 10 ml) empacada en secuencia con un tapón de fibra de vidrio, 0.5 cm de arena blanca, 5 g de alúmina básica, 4 g de florisil, 0.5 cm de arena blanca y 0.5 cm de sulfato de sodio anhidro. El acondicionamiento de la columna se realizó con 10 mL de hexano, posteriormente se traspasó el extracto a la columna y se eluyó en secuencia con 10 mL hexano:diclorometano (1:1) y 20 mL de diclorometano. El extracto obtenido fue evaporado mediante un evaporador Rocket, transferido a tubos de concentración y evaporados bajo flujo de nitrógeno hasta casi sequedad. Finalmente, los extractos fueron resuspendidos hasta un volumen final de 0.5 mL con isooctano, a los cuales se adicionaron los estándares internos (1-Clorooctadecano para alcanos y p-terfenil d<sub>14</sub> para PAHs) previo a su análisis en el cromatógrafo de gases.

### **5.5.2 Determinación de hidrocarburos alifáticos en tejido blando de *Crassostrea virginica*.**

Los extractos obtenidos de las muestras de organismos fueron analizados mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID). Para la separación de los analitos de interés se empleó una columna DB-5MS (Agilent Technologies, Inc)

de 30 m x 0.32  $\mu\text{m}$  x 0.25  $\mu\text{m}$  a flujo constante de 1.6 mL/min utilizando  $\text{N}_2$  como gas acarreador. El programa en el horno fue una temperatura inicial de 60  $^{\circ}\text{C}$  por 3 min, seguido de una rampa de 8  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  hasta alcanzar una temperatura de 300  $^{\circ}\text{C}$  por 40 min, para un tiempo total de corrida de 73 min. El modo de inyección utilizado fue splitless, mientras que se utilizó una temperatura de 275  $^{\circ}\text{C}$  en el puerto de inyección y de 315  $^{\circ}\text{C}$  en el detector. En tanto, se manejó un flujo de  $\text{H}_2$  de 30 mL/min y de aire de 250 mL/min para la generación de la flama en el detector. Para la cuantificación se utilizó el método de estándar interno. Los compuestos analizados en este trabajo incluyen los alcanos pares e impares a partir del C10 hasta el C40, así como los compuestos pristano y fitano.

### **5.5.3 Determinación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) en tejido blando de *Crassostrea virginica*.**

Los extractos obtenidos fueron analizados mediante cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo de masas (GC-MSD) en modo de impacto electrónico (EI). Para la separación de los analitos de interés se empleó una columna DB-5MS (Agilent Technologies, Inc) de 30 m x 250  $\mu\text{m}$  x 0.25  $\mu\text{m}$  con un flujo constante de 1 mL/min con He como gas acarreador. El programa en el horno consistió en una temperatura inicial de 70  $^{\circ}\text{C}$  por 0 min y una rampa de 5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  hasta alcanzar una temperatura final de 325  $^{\circ}\text{C}$ , la cual fue mantenida por 6 min, para un tiempo total de corrida de 60 min. El modo de inyección empleado fue splitless, y se utilizó una temperatura de 280  $^{\circ}\text{C}$  tanto en el puerto de inyección como en la interfase con el detector. Las temperaturas de la fuente y los cuádruplos fueron de 230 y 150  $^{\circ}\text{C}$ ,



respectivamente. El modo de adquisición consistió en el monitoreo de ion simple (SIM) y en modo de barrido completo (full SCAN; 30-650 u.m.a.) para los 25 compuestos a analizar. Para la cuantificación se utilizó el método de estándar interno. La lista de compuestos analizados en este trabajo incluyó: naftaleno, 1-metilnaftaleno, 2-metilnaftaleno, bifenilo, 2-dimetilnaftaleno, acenaftileno, acenafteno, 3-trimetilnaftaleno, fluoreno, dibenzotiofeno, fenantreno, antraceno, 1-metilfenantreno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, benzo(e)pireno, perileno, benzo(g,h,i)perileno, dibenzo(a,h)antraceno, indeno (1,2,3)pireno.

## **5.6 Análisis Histológico**

La sección de gónada destinada para la identificación del estadio de madurez de los organismos utilizados fue fijada en solución Davidson y procesada en el laboratorio de Histología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV, Mérida Yucatán, México) mediante técnicas de histología clásica, lavado, deshidratación-infiltración, inclusión en parafina, cortes de 7  $\mu\text{m}$  y tinción mediante el método convencional de hematoxilina-eosina (Humanson, 1972) (Fig. 7).

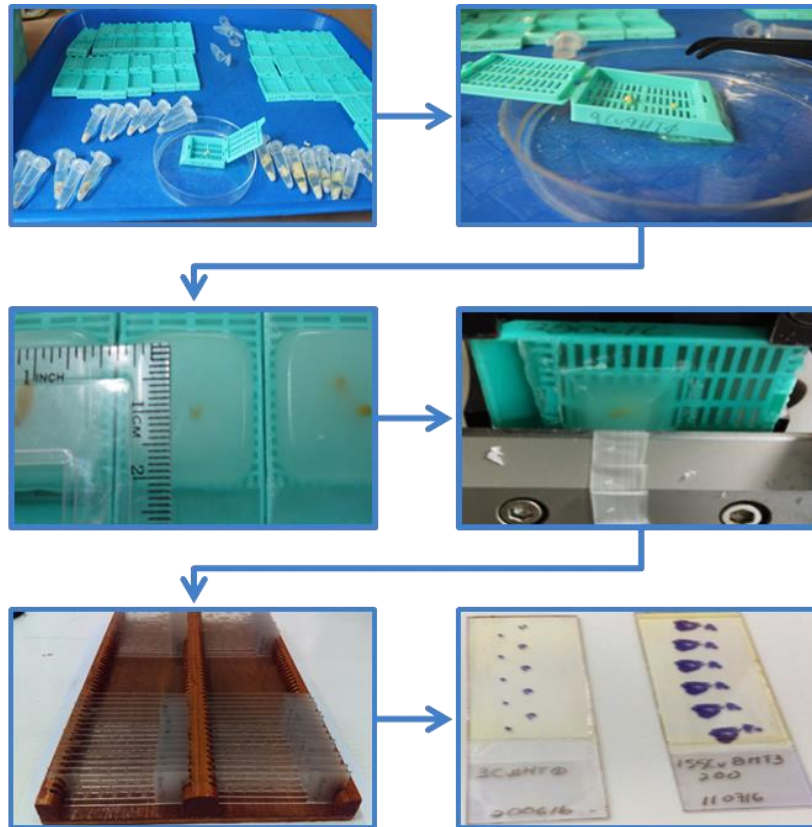


Figura 7. Obtención de laminillas para análisis histológico del tejido gonádico de *C. virginica* (Proporcionada por la Dra. Martha Enríquez Díaz, del laboratorio de histología de CINVESTAV, Mérida).

### 5.6.1 Determinación de sexo en *Crassostrea virginica*.

La presencia de células sexuales, así como la ausencia de estas, definieron a los individuos como machos, hembras, hermafroditas o sexualmente indiferenciados (Aldana-Aranda et al., 2014).

### 5.6.2 Determinación de desarrollo gonádico / estadio reproductivo.

A cada ejemplar se le asignó una escala de desarrollo gonadal, caracterizándolo de acuerdo con el estadio de desarrollo que ocupó más del 50 % del área de la gónada en el corte. Esta escala constó de 5 estadios de acuerdo a Aldana-Aranda et al. (2014):

- ❖ Estadio I (Indiferenciado o Reposo). No se pueden diferenciar los sexos; los folículos son inexistentes o algunos con pocas células germinales indiferenciadas. Se observa mucho tejido conectivo.
- ❖ Estadio II (Gametogénesis). Inicia con folículos pequeños y alejados con numerosas ovogonias y espermatogonias, hasta folículos activamente desarrollados con gran número de ovocitos en hembras y espermatocitos, espermátidas y algunos espermatozoides en los machos.
- ❖ Estadio III (Madurez). Los folículos maduros se encuentran completamente llenos de gametos maduros. En hembras se distinguen ovocitos con núcleo y nucléolo. En machos, las colas de los espermatozoides están orientados hacia la luz del folículo.
- ❖ Estadio IV (Liberación). Los folículos se encuentran parcialmente vacíos, los ovocitos y espermatozoides se encuentran libres dentro del folículo.
- ❖ Estadio V (Post Liberación). Los folículos se encuentran casi totalmente vacíos, con pocos gametos remanentes. Se puede observar la presencia de tejido conectivo dentro de los folículos.

## **5.7 Análisis transcriptómico de gónada de organismos indiferenciados de *Crassostrea virginica*.**

### **5.7.1 Extracción de RNA total de gónada**

Las muestras de gónada destinadas para el análisis transcriptómico (n=32) fueron preservadas en RNAlater® (Ambion, Life technologies) y almacenadas a -80°C, hasta su uso. La extracción de RNA total se realizó con el kit RNeasy Mini Plus® (Qiagen, Valencia, CA, USA) siguiendo las recomendaciones del proveedor. La cuantificación del RNA total se realizó con un NanoDrop ND-2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) y se eliminó el DNA genómico residual con el kit RQ1 RNase-Free DNase I (Promega, Madison, WI, USA).

El RNA total libre de DNAsas fue cuantificado con un Qubit® 3.0 (Life technologies, USA) y su integridad fue evaluada mediante electroforesis capilar utilizando un Agilent 2100 Bioanalyzer y el kit RNA 6000 Nano (Agilent Technologies, Germany). Muestras con un valor de RIN (RNA Integrity Number) mayor a 7 fueron consideradas para la preparación de bibliotecas.

### **5.7.2 Preparación de bibliotecas y secuenciación masiva del RNA (RNA-Seq)**

Las muestras con valores de RIN > 7 fueron utilizadas para la construcción de las bibliotecas tipo pair-end, la cual se realizó con el Truseq® RNA Sample Prep kit v2 Set A (Illumina, San Diego, CA, USA). Cada tratamiento estuvo conformado por dos réplicas biológicas. A su vez, cada réplica biológica consistió en un pool de 4 organismos clasificados como indiferenciados mediante histología. Previo a la preparación de las

bibliotecas, cada pool fue generado mezclando 1 µg de RNA total de cada una de sus muestras correspondientes. Las bibliotecas fueron cuantificadas con un Qubit® 3.0 usando el Qubit™ dsDNA Broad Range Assay (Life Technologies, USA) y se observaron en un gel de agarosa al 4%. El tamaño promedio de las bibliotecas fue determinado en un Agilent 2100 Bioanalyzer usando el kit DNA 1000 (Agilent Technologies, Germany). La concentración final de las bibliotecas fue diluída a 10 pM. Para la secuenciación, se utilizó la plataforma Illumina MiSeq y el Kit MiSeq® System Reagent V3, generando lecturas de tipo pair-end de 76 bp.

### **5.7.3 Análisis bioinformático**

#### **5.7.3.1 Ensamblado de novo del transcriptoma**

La calidad de las lecturas crudas se evaluó utilizando FastQC (Andrews, 2010) y visualizando con MultiQC (Ewels et al., 2016). El procesamiento de la biblioteca se realizó con Trimmomatic v0.36 (Bolger et al., 2014).

Los adaptadores de cada biblioteca fueron removidos utilizando TruSeq 3-PE, las lecturas debajo de las 36 bases de longitud se descartaron y la calidad promedio  $\leq 25$  se cortó dentro de una sliding window de 5 bases. Una biblioteca sin procesar con un tamaño total  $89,679,436 \pm 1,116,408$  fue contabilizada y el 93% de las lecturas fueron procesadas para los análisis posteriores.

Para detectar fuentes de contaminación por el manejo en laboratorio, las lecturas pre-procesadas fueron mapeadas contra Univec database (2013), PhiX y el genoma de *C.*

*virginica* (Refseq accession NC\_001422.1 and refseq assembly ID GCF\_002022765.2 respectively) utilizando la herramienta `fastq_screen` ([https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastq\\_screen/](https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastq_screen/)). Enfocándonos en lecturas no mapeadas y múltiples alineamientos de secuencia por base de datos. Un pequeño porcentaje de múltiples hits ( $0.001\% \pm 0$ , mean+s.d) se encontró con Univec y cero hits con PhiX, encontrándose un  $79 \pm 3\%$  de lecturas con el genoma de *C. virginica* (ANEXO 1).

Todas las lecturas pre-procesadas fueron concatenadas en dos pares de datos (forward y reverse), los cuales fueron utilizados como archivos de entradas para el ensamble de novo en Trinity v2.4.0 in a non-strand-specific mode (Haas et al., 2013). La calidad del ensamble fue corroborada con TransRate (Smith-Unna et al., 2016).

### **5.7.3.2 Estimación de abundancia y análisis de expresión génica**

Tanto el ensamblaje de transcriptoma *de novo* como todas las bibliotecas pre-procesadas se usaron como archivo de entrada para realizar un análisis de expresión específico de la muestra. Todas las lecturas se alinearon con el transcriptoma de novo indexado ensamblado usando Bowtie2 (Langmead and Salzberg, 2012) seguido por el cálculo de los niveles de expresión de genes e isoformas usando Expectation-Maximization algorithm incluido en los módulos de expresión diferencial de Trinity (`align_and_estimate_abundance.pl`).

### **5.7.3.3 Análisis de expresión diferencial**

Con el fin de identificar patrones globales de expresión diferencial, las matrices de recuento de lecturas específicas obtenidas durante el paso de estimación de abundancia se usaron junto con el paquete de R edgeR (Robinson et al., 2010). Para la visualización se utilizaron ggplot y heatmap3 (Zhao et al., 2014) en R.

Cada dato cuantificado se normalizó utilizando el método de trimmed mean of M-values (TMM), que se ajustó para el tamaño de la biblioteca y se redujo el efecto compositivo del ARN con run\_DE\_analysis.pl, utilizando un valor de dispersión de 0.01 debido a las réplicas biológicas.

Solo los genes con un P-value ajustado (FDR, False Discovery Rate)  $< 1e-2$  y con por lo menos un cambio doble en la expresión fueron considerados como diferencialmente expresados en la comparación pareada de las muestras.

### **5.7.3.4 Anotación funcional del transcriptoma**

La anotación se realizó utilizando la base de datos ncbi-blast-2.4.0 contra UniProtKB/Swiss-Prot2. La anotación funcional se realizó con Blast2GO® v4.1 (Conesa et al., 2005) y la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). La anotación metabólica además del análisis de la vía metabólica fue realizada con PANTHER software (Mi et al., 2017).

## 5.8 Validación de los genes de maduración gonadal mediante qPCR

### 5.8.1 Síntesis de ADN complementario (cDNA)

El RNA tratado con DNAsa obtenido de 32 organismos indiferenciados en el apartado 2.7.1 fue utilizado para la síntesis de cDNA, la cual se realizó con 250 ng de RNA y el kit ImProm-II™ Reverse Transcription System siguiendo las recomendaciones del fabricante (ANEXO 2).

### 5.8.2 Identificación de genes de referencia

Del transcriptoma obtenido se seleccionaron genes que no presentaron variación alguna en los tiempos de muestreo del tratamiento de 200 µg/L respecto al control (FDR = 1). Los genes seleccionados se utilizaron como genes de referencia en los análisis de PCR tiempo real y de los cuales se diseñaron los primers específicos que se muestran en la tabla 1.

**Tabla 1. Primers específicos para genes de referencia identificados en el transcriptoma de *Crassostrea virginica*.**

Gen	Secuencia (5' – 3')	Longitud (pb)	Tm (°C)	%GC	Tamaño del fragmento (pb)
<b>TSPO</b> Translocator protein	F AGGCTGAAGCAAATGTGACC	20	58.7	50	89
	R AGCAACGATTGTCACCTTCC	20	58.5	50	
<b>RPL19</b> (60S ribosomal protein L19)	F AACAACTCAGTGACCAAGCC	20	58.3	50	82
	R TTCTGCTTGATGCGCTCTTC	20	58.9	50	
<b>RPS24</b> (40S ribosomal protein S24)	F ACGAAAAAGGCGAAGGTTGG	20	59.3	50	84
	R GGCTACTGACAACACACAAACC	22	60	50	
<b>KS6A1</b> (Ribosomal S6 kinase alpha-1)	F TGCAGATTGTGGCCAAAACG	20	50	50	124
	R TCACAAATTCGCAGGCTGTC	20	59.1	50	



<b>NATD1</b> (N-Acetyltransferase Domain Containing 1)	F GTGCGACTCACAAGGGAAAATC	22	60.1	50	121
	R TCCATGAGCGACTGGACAATC	21	60.1	52	
<b>UBP37</b> (Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 37)	F ACCAAGGCCAAAGACGAAAG	20	58.7	50	132
	R GCCATTTGGATGCGAATTGC	20	59.1	50	

### 5.8.3 Análisis de expresión génica cuantitativa mediante PCR en tiempo real

Para el análisis de expresión génica cuantitativa se utilizó cDNA de gónada de organismos indiferenciados (n = 16) por triplicado. Estos fueron expuestos a una concentración de 200 µg/L de una mezcla ligera de hidrocarburos y se muestrearon a los 7 (T1), 14 (T2) y 21 días de exposición, así como un control, el cual consistió en organismos sin exponer a hidrocarburos.

Se realizó la validación de la expresión de los genes de referencia que se muestran en la tabla 1. Los genes de interés se muestran en la tabla 2, los cuales fueron identificados y seleccionados del transcriptoma obtenido. Estos genes presentaron expresión diferencial y están relacionados con la maduración gonadal de organismos indiferenciados de *C. virginica*. De estos genes se diseñaron primers específicos los cuales se muestran en la tabla 2.

**Tabla 2. Primers específicos para genes relacionados con la maduración gonadal de *C. virginica*.**

Gen	Secuencia (5' – 3')	Longitud (pb)	Tm (°C)	%GC	Tamaño del fragmento (pb)
<b>ARSB</b> (Arylsulfatase B)	F TTTCCACCTGCAACAACGAG	20	59.0	50	130
	R ACTCACGCTGTCGGAAAATG	20	58.9	50	
<b>DDX5</b> (Probable ATP-)	F TTGCCCACTGCGAAAAGTAAC	20	59.1	50	145
	R TGTGTTGGAGTCTTACCCAGTG	22	59.9	50	

dependent RNA helicase DDX5)						
<b>FZD5</b> (Frizzled-5)	F TTTTGGCGCTGAAGCAAGTC	20	59.0	50	130	
	R ACAAGAACTGCCACACGAAC	20	60.0	50		
<b>LIPR1</b> (Inactive pancreatic lipase-related protein 1)	F AAGTTTTGCGGCCATGATGC	20	60.4	50	120	
	R AATGAATTTGCCGCCTCCAG	20	59.2	50		
<b>M3K7</b> (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7)	F AAGCGAATGCAAGTCTCACG	20	59.2	50	127	
	R GTTGAAGTGGCCACATTTTGC	21	59.1	48		
<b>P85A</b> (Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit Alpha)	F AAAACTTGCTGCGCAACCAG	20	60.5	50	104	
	R GCCATTGCACACAATAGACAGG	22	60.2	50		
<b>STDB1</b> (Starch-binding domain-containing protein 1)	F TGGCGTAAAAACCACACTGC	20	59.6	50	117	
	R AGTTCCACTGGACACTTCACC	21	59.9	52		

#### 5.8.4 Estandarización de la amplificación de los genes de estudio por PCR punto final.

Se realizó PCR punto final para estandarizar la  $T_m$  de los primers previamente diseñados (Tabla 1 y Tabla 2) y asegurar que amplifican el fragmento esperado. Para lo que se realizó un gradiente de temperatura. Las características de la reacción y las condiciones del programa para el PCR punto final, se especifican en las Tablas 3 y 4. Se utilizó un pool de 32 organismos, en el que se incluyeron hembras y machos maduros además de organismos indiferenciados.

Tabla 3. Mezcla de reacción.

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Concentración final
Agua	5.3	--
Buffer 5X	2.0	1X
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1.0	2.5 mM
dNTP's	0.2	0.2 mM
F (10 $\mu\text{M}$ )	0.25	0.25 $\mu\text{M}$
R (10 $\mu\text{M}$ )	0.25	0.25 $\mu\text{M}$
GoTaq Flexi (5U/ $\mu\text{l}$ )	0.1	0.05 U
cDNA (1:5)	1.0	~ 50 ng
Volumen final	10	

Tabla 4. Condiciones de PCR para estandarizar primers.

Etapa	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Duración	Ciclos
Desnaturalización	95	2 min	1
Desnaturalización	95	30 seg	} 35
Alineamiento	Gradiente (58, 60, 62, 64)	30 seg	
Extensión	72	30 seg	
Extensión	72	5 min	1
Termino	4	$\infty$	1

### 5.8.5 Estandarización de la eficiencia de los primers diseñados

Se determinó la eficiencia ( $e$ ) para cada par de primers diseñado (genes de referencia e interés) de acuerdo con Pfaffl (2001). Se realizaron cuatro diluciones seriadas (1:5) del pool de cDNA de los 32 organismos, cada dilución se amplificó por triplicado con los 6 genes de referencia y con los 8 de interés. Se obtuvo una curva estándar para cada gen amplificado, en donde se observa la eficiencia y coeficiente de determinación ( $R^2$ ) (ANEXOS 4 y 5). El análisis fue realizado en el termociclador en

tiempo real CFX96 (Bio-Rad) y se utilizó el master mix 2x Eva Green con Accustart taq (tabla 5).

**Tabla 5. Master mix 2x Eva Green – Accustart taq**

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Buffer colorless (10x)	200
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	100
dNTP's (10 mM)	40
Accustart taq (5U/ $\mu\text{L}$ )	12
Eva Green (20x)	100
Agua	548
Vol Final	1000

La mezcla de reacción por muestra se realizó de la siguiente manera: 5  $\mu\text{L}$  de EvaGreen 2x, 0.2  $\mu\text{L}$  de cada primer (forward y reverse), 3  $\mu\text{L}$  de cDNA (dilución 1:10) y 1.6  $\mu\text{L}$  de agua, para un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ . Las condiciones de amplificación se muestran en la tabla 6.

**Tabla 6. Condiciones de amplificación para PCR en tiempo real**

Etapa	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Duración	Ciclos
Desnaturalización	95	3 min	1
Desnaturalización	95	30 seg	} 40
Alineamiento	60	30 seg	
Extensión	72	30 seg	
Extensión	72	5 min	1
Análisis de curva de disociación	95	10 seg	1
Disociación	65 – 95 (incremento de 0.5)	5 seg	1

### **5.8.6 Validación de genes de referencia para el análisis de muestras de gónada.**

Se realizó la validación de los genes de referencia KS6A1, NATD1, RPL19, RPS24, TSPO y UBP37, mediante la evaluación de estabilidad de su expresión. Lo anterior con la herramienta RefFinder de Cotton EST Database East Carolina (<http://150.216.56.64/referencegene.php?type=reference>), la cual integra distintos métodos de evaluación de la estabilidad de expresión de los genes de referencia (Delta CT, BestKeeper, Normfinder y Genorm). Se utilizaron 16 muestras de cDNA pertenecientes a la gónada de organismos expuestos a 200 µg/L de hidrocarburos en tres tiempos de muestreo (7, 14 y 21 días de exposición) y al grupo control, cada tratamiento con 4 organismos. Se utilizaron controles positivos para cada gen y como control negativo agua libre de nucleasas.

### **5.8.7 Análisis de expresión relativa de los genes ARSB, DDX5, FZD5, LIPR1, M3K7, P85A, STDB1 y TEMPT.**

La expresión relativa de los genes ARSB, DDX5, FZD5, LIPR1, M3K7, P85A, STDB1 Y TEMPT se calculó para 100 copias de cada gen de referencia utilizado (KS6A1, TSPO Y NATD1) con la ecuación:  $N = 100 * 2^{(Ct\ Gen\ Ref - Ct\ Gen\ Interés)}$  (Rodet et al., 2005).

## **5.9 Análisis estadísticos**

Para la realización de los análisis estadísticos se utilizaron las aplicaciones estadísticas del programa SigmaPlot versión 12.0. En este programa se realizó el análisis de normalidad utilizando la prueba Shapiro-Wilk y de homocedasticidad de varianzas.

### **5.9.1 Análisis de expresión diferencial mediante qPCR**

Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para evaluar el efecto del tiempo de exposición a la concentración de 200 µg/L de hidrocarburos en los niveles de expresión de los genes de interés relacionados con la maduración gonadal (ARSB, DDX5, FZD5, LIPR1, M3K7, P85A1, STDB1 y TEMPT).

Cuando los datos no pasaron los análisis de normalidad y de varianzas se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comparación de medianas.

El nivel de significancia considerado fue de  $p \geq 0.05$ . En los casos donde se encontraron diferencias significativas se realizó un análisis a posteriori de comparación múltiple pareado usando el método de Student-Newman-Keuls para comparación de medias (paramétrica) o la prueba de Dunn para comparación de medianas (no paramétrica).

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Concentración de hidrocarburos en sedimento de la Laguna Morales, La Pesca, Soto La Marina Tamaulipas.

Se realizaron análisis de hidrocarburos en las muestras de sedimento tomadas *in situ* para asegurar que fuera una zona no contaminada por este tipo de compuestos. Esta laguna está certificada por el Programa Mexicano de Sanidad de Moluscos Bivalvos (PMSMB), conformado por diversas autoridades (SS, SAGARPA, SEMARNAT, SEMAR), coordinadas por la Secretaría de Salud a través de la COFEPRIS como una zona de cosecha de ostión apta para consumo humano. En la Figura 8A, se observan 10 tipos de hidrocarburos alifáticos detectados con una concentración menor a 100 ng/g peso seco (C31, C26, C25, C23, C22, C19, C17, C16, C15 y Phytane). Los PAHs detectados en sedimento fueron 12 y correspondieron a Benzo[e]pyrene, Chrysene, Benz[a]anthracene, Pyrene, Fluoranthene, Phenanthrene, Dbthiophene, Fluorene, 3-Trimethylnaphtalene, 2-Methylnaphtalene, Biphenyl y Naphthalene, con una concentración total de 39 ng/g peso seco (Fig. 8B). Para zonas con altos niveles de contaminación, se han detectado concentraciones de PAHs entre 1000 ng/g peso seco (Men et al., 2009) hasta valores de 6600 ng/g en zonas cercanas a refinerías (Tolosa et al., 2005). Gogou et al. (2000) reportan como concentraciones “bajas” de hidrocarburos alifáticos valores en el rango de 562-5,607 ng/g y desde 14.6 -158.5 ng/g en el caso de los PAHs. Con lo anterior se puede decir que la concentración de hidrocarburos en la Laguna Madre es baja y de acuerdo con lo reportado en otros sitios no muestra impacto

por las actividades realizadas en esta área. Por lo que se considera que los organismos estuvieron libres de contaminación por hidrocarburos.

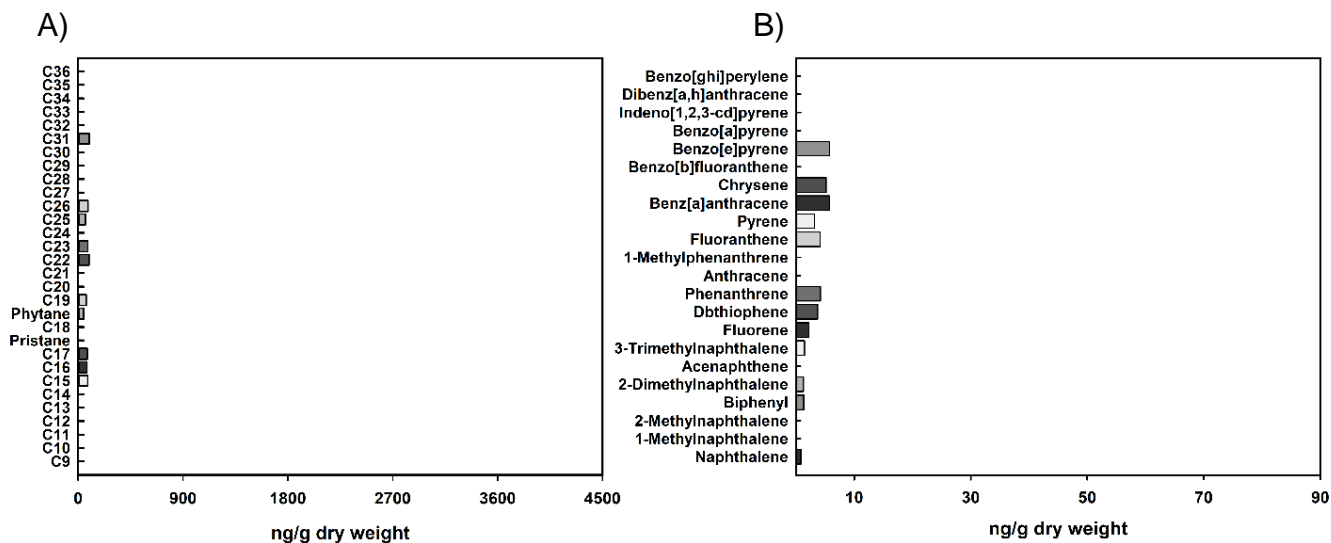


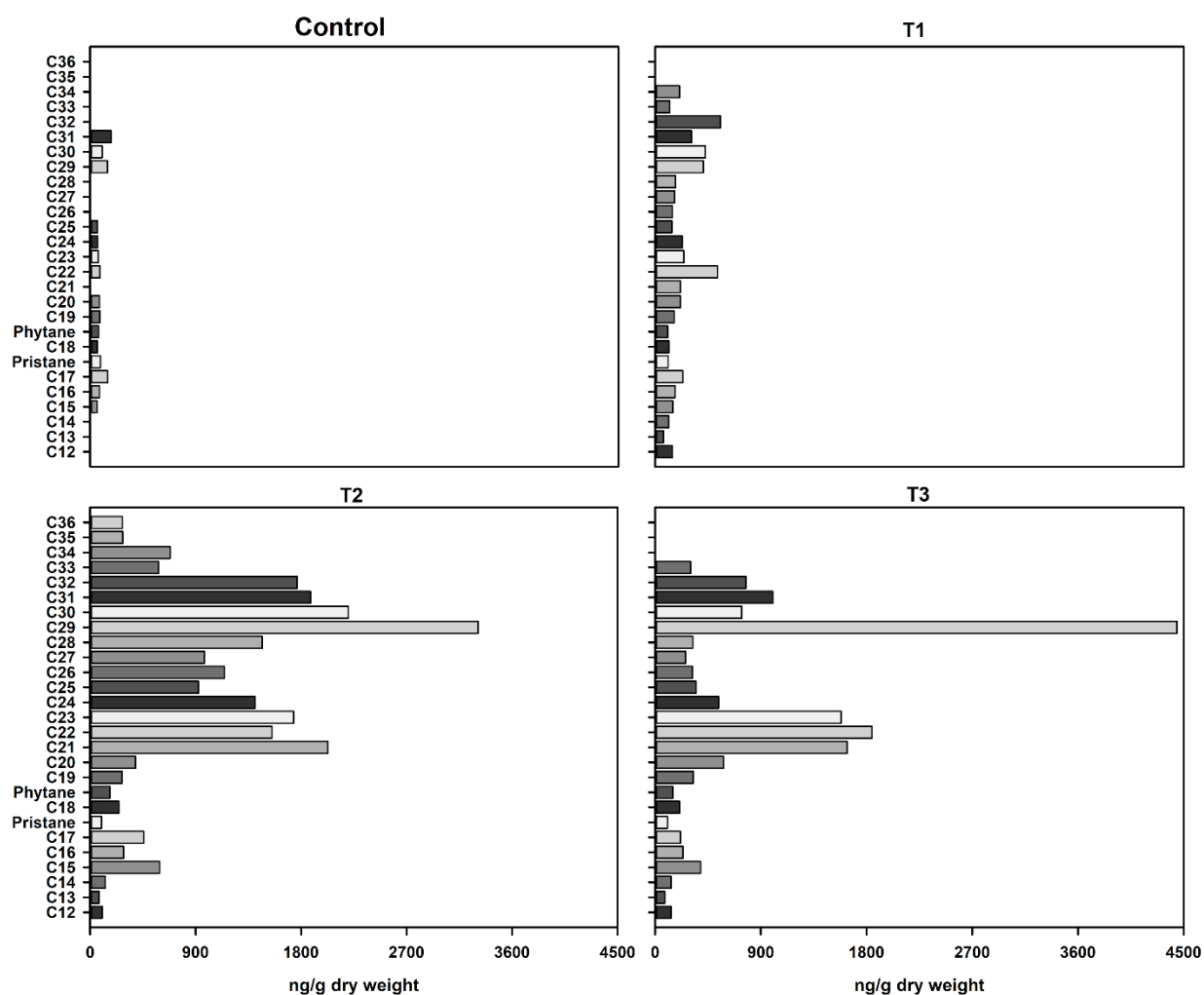
Figura 8. Hidrocarburos detectados en el sedimento de la Laguna Madre (La Pesca, Soto La Marina, Tamaulipas. A) Alifáticos y B) Policíclicos aromáticos.

## 6.2 Concentración de hidrocarburos en el tejido blando de *Crassostrea virginica*.

Los hidrocarburos alifáticos detectados en el tejido blando de *C. virginica* en los cuatro muestreos realizados (T0 = control, T1 = 7 días, T2 = 14 días, T3 = 21 días) se presentan en la Figura 9. En T0 (tratamiento control) se detectaron 15 hidrocarburos, con una concentración de 1,382.05 ng/g de peso seco, la cual es menor a la concentración reportada por Carro et al. (2006) para zonas contaminadas por tráfico de embarcaciones y de actividades industriales y urbanas (5,098.01 ng/g en *Mytilus galloprovincialis* y 17,579.37 ng/g en *Cerastoderma edule*).



La concentración total de hidrocarburos en el tejido blando aumenta del T1 al T2, pasó de 5,487 a 25,030 ng/g peso seco. Siendo el hidrocarburo C29 el de mayor concentración y que ha sido reportado en sedimentos contaminados como un hidrocarburo alifático predominante (Noboru-Nishigima et al., 2001). Para el T3 la concentración de la mayoría de los hidrocarburos alifáticos disminuye, excepto la del C29, C23, C22 y C21 en donde se puede ver un aumento (Fig. 9), lo cual podría indicar que estos componentes son más difíciles de metabolizar para *C. virginica* en los 21 días que duró el experimento.



**Figura 9. Hidrocarburos alifáticos detectados en el tejido blando de *C. virginica*. Control = 0 µg/L de hidrocarburos, T1 = 7 días a 200 µg/L, T2 = 14 días a 200 µg/L y T3 = 21 días a 200 µg/L.**

Los PAHs detectados en el tejido blando de *C. virginica* en los cuatro muestreos realizados (T0 = control, T1 = 7 días, T2 = 14 días, T3 = 21 días) se muestran en la figura 10. En el tratamiento control, se observan solo 4 hidrocarburos con una concentración menor a 10 ng/g peso seco cada uno y corresponden a criseno, benz[a]antraceno, pireno y fluoranteno. Para los muestreos del T1 al T3 se observa que los dos PAHs con mayor concentración son el benzo[a]pireno e indeno(1,2,3)pireno, con una concentración promedio de 68 y 51 ng/g peso seco, respectivamente. Se ha demostrado que el benzo[a]pireno ha tenido efectos negativos en la maduración gonadal de algunos bivalvos, en hembras maduras de *Chlamys farreri* suprimió la producción de hormonas esteroideas (Tian et al., 2013), por lo que ya ha sido considerado como disruptor endocrino en este bivalvo (Zhang et al., 2012). En machos del mejillón *Perna viridis*, el benzo[a]pireno podría inhibir el desarrollo de células germinales y la maduración gonadal (Song et al., 2016). Asimismo, se observó una tendencia hacia la acumulación de PAHs a través el tiempo, principalmente de benzo[a]pireno e indeno(1,2,3)pireno. Se ha establecido que el benzo[a]pireno es metabolizado y altamente acumulable en el tejido de *C. farreri* (Pan et al., 2008).

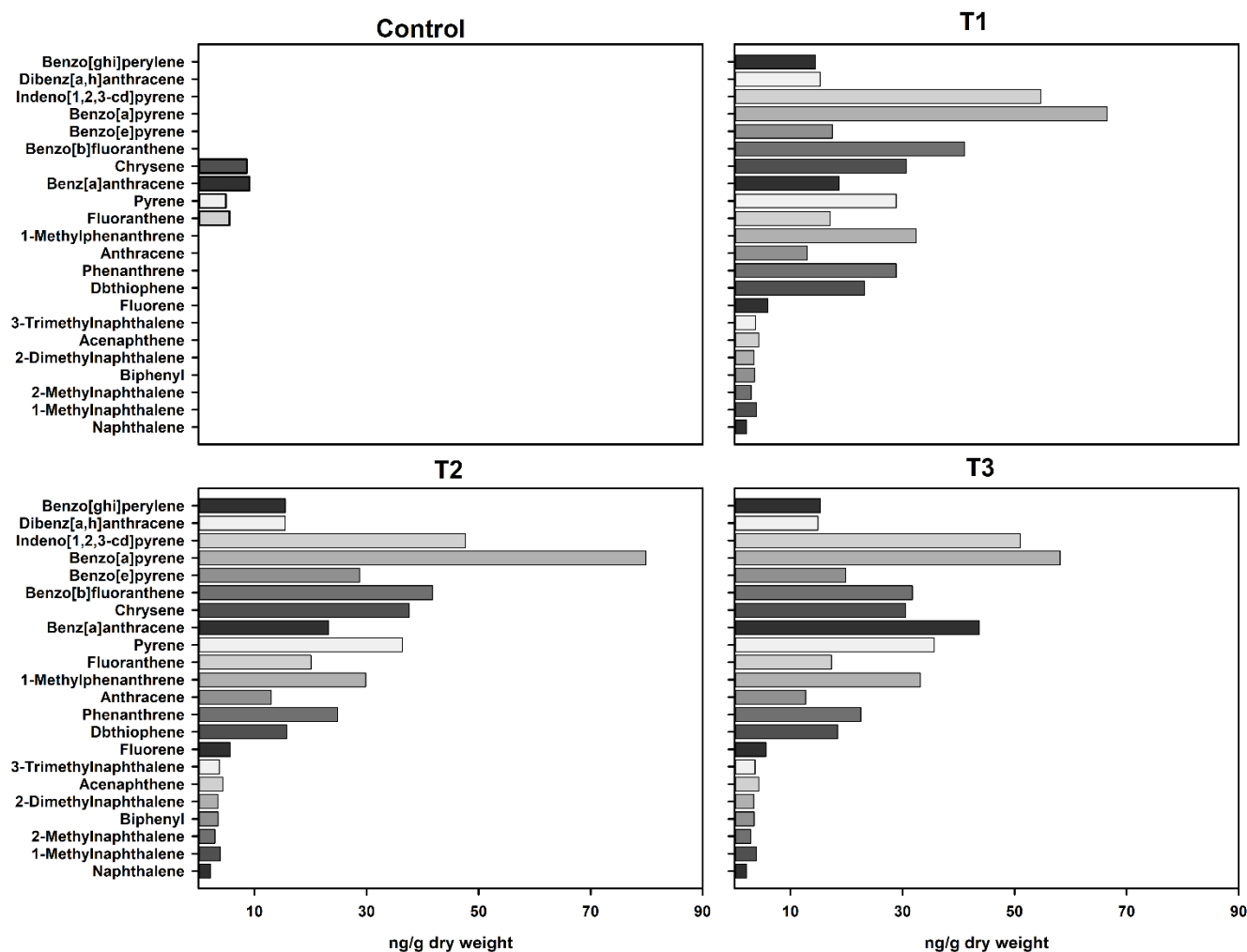


Figura 10. Hidrocarburos policíclicos aromáticos detectados en el tejido blando de *C. virginica*. Control = 0  $\mu\text{g/L}$  de hidrocarburos, T1 = 7 días a 200  $\mu\text{g/L}$ , T2 = 14 días a 200  $\mu\text{g/L}$  y T3 = 21 días a 200  $\mu\text{g/L}$ .

Al comparar ambos tipos de hidrocarburos (alifáticos y PAHs) algo que resalta es la concentración que alcanza cada uno, mientras que los PAHs presentaron un valor promedio de 442 ng/g peso seco en los tres muestreos, lo alifáticos tuvieron una concentración promedio de 15,729 ng/g peso seco. Respecto a lo anterior Wentzel et al. (2007) mencionan que los hidrocarburos alifáticos son el principal constituyente del

petróleo, pero a pesar de eso son los primeros en ser degradados por microorganismos (Capelli et al., 2001).

De acuerdo con Leahy y Coldwell (1990), los hidrocarburos presentan diferentes grados de susceptibilidad a la degradación, en función de su estructura molecular: n-alcános > alcanos ramificados > aromáticos de bajo peso molecular > cicloalcanos > PAHs, lo que explicaría que la concentración de los PAHs en tejido blando a través del tiempo no disminuya.

La prevalencia de los PAHs a través del tiempo en los organismos de este experimento dependió del número de anillos presentes en la estructura de estos compuestos (Fathepure, 2014). En *C. virginica* los compuestos con mayor concentración poseen un alto peso molecular y presentan más de tres anillos en su estructura (Kanaly and Harayama, 2000) (Fig.11).

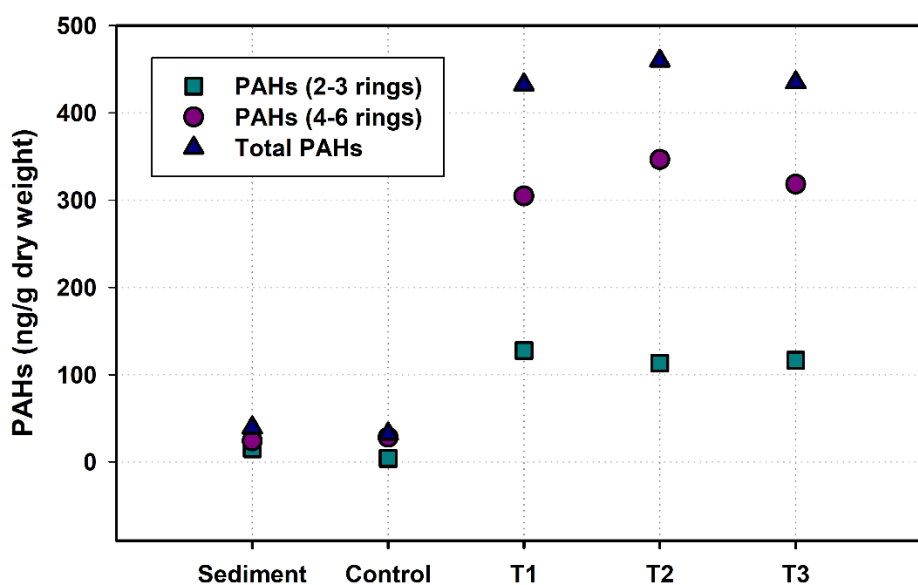
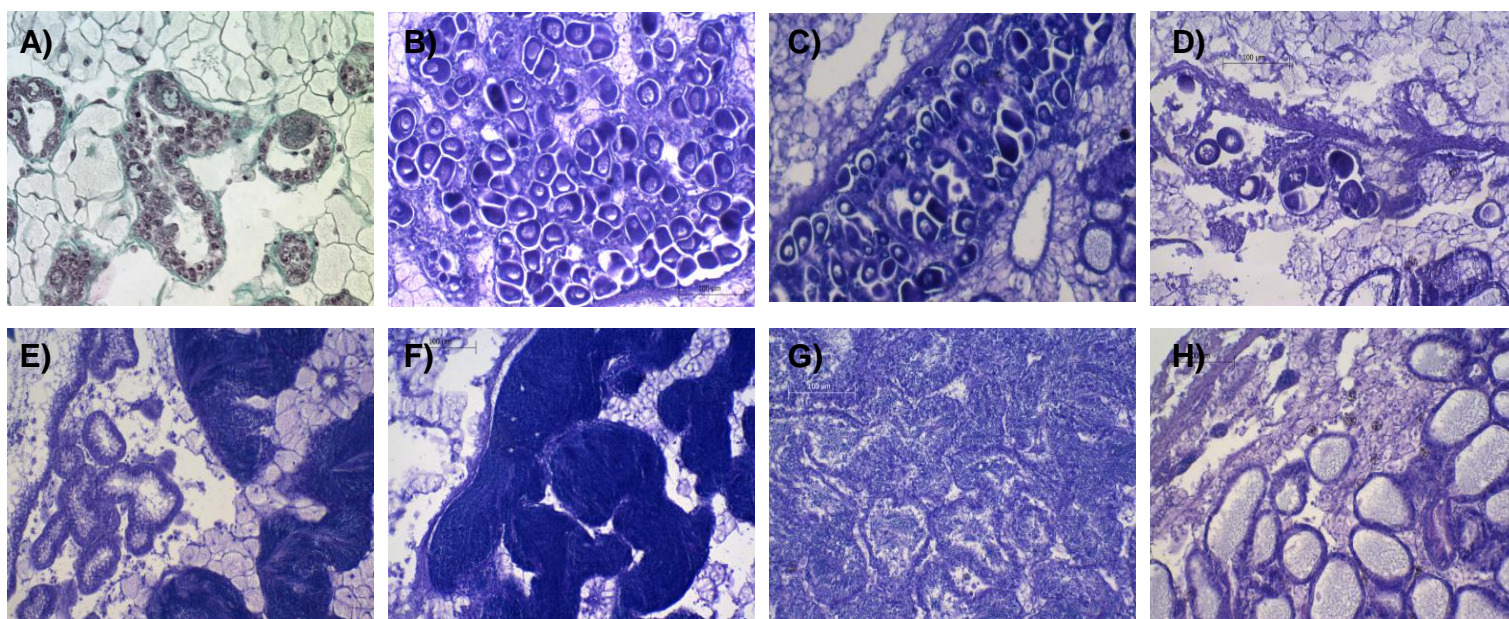


Figura 11. Anillos en la estructura de los hidrocarburos policíclicos aromáticos identificados.

### 6.3 Análisis histológico de *C. virginica* para identificación de sexos y evaluación del efecto de los hidrocarburos en el tejido gonadal.

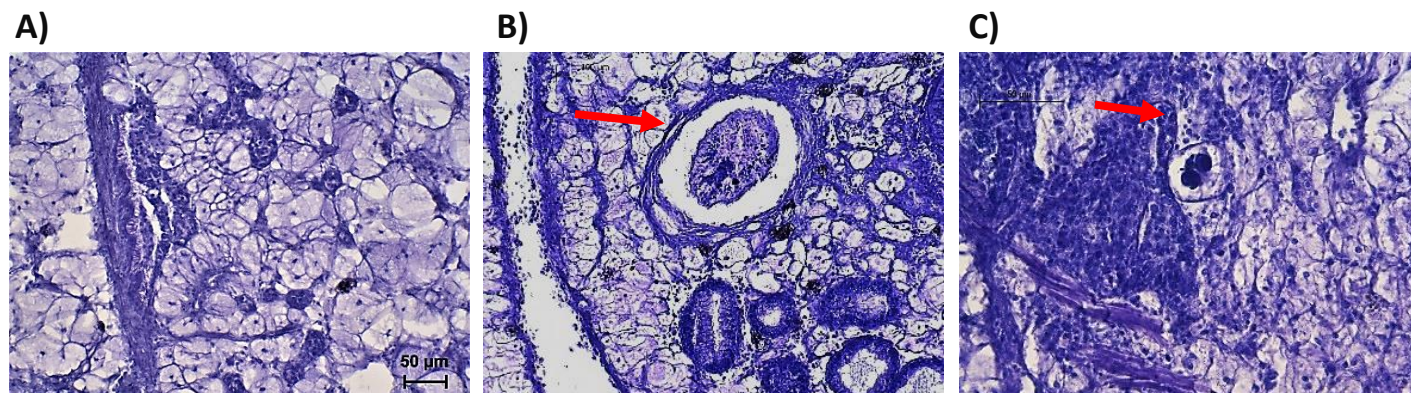
En el presente estudio, se identificó el sexo de los organismos utilizados, así como los distintos estadios de maduración gonadal descritos por Aldana-Aranda et al. (2014) para *C. virginica* (Fig. 12). El estadio de desarrollo fue asignado considerando el observado en más del 50 % del área de la gónada en el corte.



**Figura 12.** Estadios de madurez reproductiva de *C. virginica*. A) y E) Estadio II (Gametogénesis); B) y F) Estadio III (Madurez); C) y G) Estadio IV (Desove); D) y H) Estadio V (Post-desove). Hembras, A-D; Machos, E-H.

Fueron observados además organismos indiferenciados (Fig. 13A) y un hermafrodita. Se evidenció la presencia de parásitos en los organismos de los distintos tratamientos, sin observar preferencia de estos por algún tratamiento en específico (Fig. 13B y 13C).





**Figura 13. Gónada de *C. virginica*. A) Organismo indiferenciado (se observa el tejido conectivo sin folículos ni células germinales); B) Quiste de Tremátodo (parásito) en una hembra de *C. virginica*; C) Apicomplexa (parásito) en un macho de *C. virginica*.**

A nivel histológico no fue posible evidenciar algún tipo de daño debido exclusivamente a los hidrocarburos.

En otros bivalvos como *Macoma balthica* o *M. nasuta* se ha observado necrosis de la línea germinal e inflamación en el tejido gonadal como resultado de la exposición a sedimentos contaminados (PAHs, bifenilos policlorados, pesticidas y metales pesados) (Tay et al., 2003; Werner et al., 2004). En algunos bivalvos como el mejillón *Mytilus galloprovincialis* se ha observado neoplasia gonadal en organismos de zonas contaminadas con hidrocarburos (Alonso et al., 2001), mismo efecto ocasionado en zonas de derrames se ha observado para *Mya arenaria* (Yevich and Barszcz, 1975).

En el caso de *C. virginica* no fue posible observar ninguno de estos daños en el tejido, esto podría deberse al tiempo de exposición, ya que en el caso de *M. balthica* los organismos estuvieron expuestos 28 días (seis días más que el este trabajo) y la exposición fue mediante sedimento contaminado (hidrocarburos y metales pesados)

(Tay et al., 2003). De acuerdo con Tay et al. (2003), la mayor cantidad de organismos con lesiones en gónada se encontraban en zonas con concentraciones de PAHs de entre 132 y 246  $\mu\text{g/L}$ . Algo que pudo haber influido en las lesiones, además del tiempo de exposición es la estrategia de vida de *Macoma*, ya que esta almeja se entierra en el sedimento en donde se alimenta filtrando partículas a su alrededor, tomando así los hidrocarburos tanto de la columna de agua como los precipitados en el sedimento.

En contraste, en este trabajo los hidrocarburos fueron homogenizados en agua de mar y agregados a los sistemas, por lo que gran parte de estos pudieron precipitarse y no quedar disponibles para *C. virginica*.

En el trabajo realizado con *Mya arenaria*, los organismos analizados pertenecen a un trabajo de siete años de observación de organismos de zonas de derrames de petróleo y descargas. Por lo que el efecto en el tejido, además de corresponder a la estrategia de vida es el resultado de años de exposición (Yevich and Barszcz, 1975).

El último factor por considerar es la preservación las muestras para su procesamiento mediante las técnicas histológicas, lo anterior afectó la tinción hematoxilina-eosina y no fue posible distinguir de manera adecuada la tinción del núcleo y citoplasma de las células (comunicación personal con el Dr. Marco Linan).

#### **6.4 Análisis histológico cuantitativo**

La cantidad de organismos indiferenciados en los tratamientos control, 50 y 200  $\mu\text{g/L}$ , durante los tiempos de muestreo (0, 7, 14 y 21 días) se muestran en la figura 14A. Se

observa que la cantidad de organismos indiferenciados aumenta gradualmente en el tratamiento control y 50 µg/L a través del tiempo, mientras que en el tratamiento de 200 µg/L hay un incremento desde el día 7.

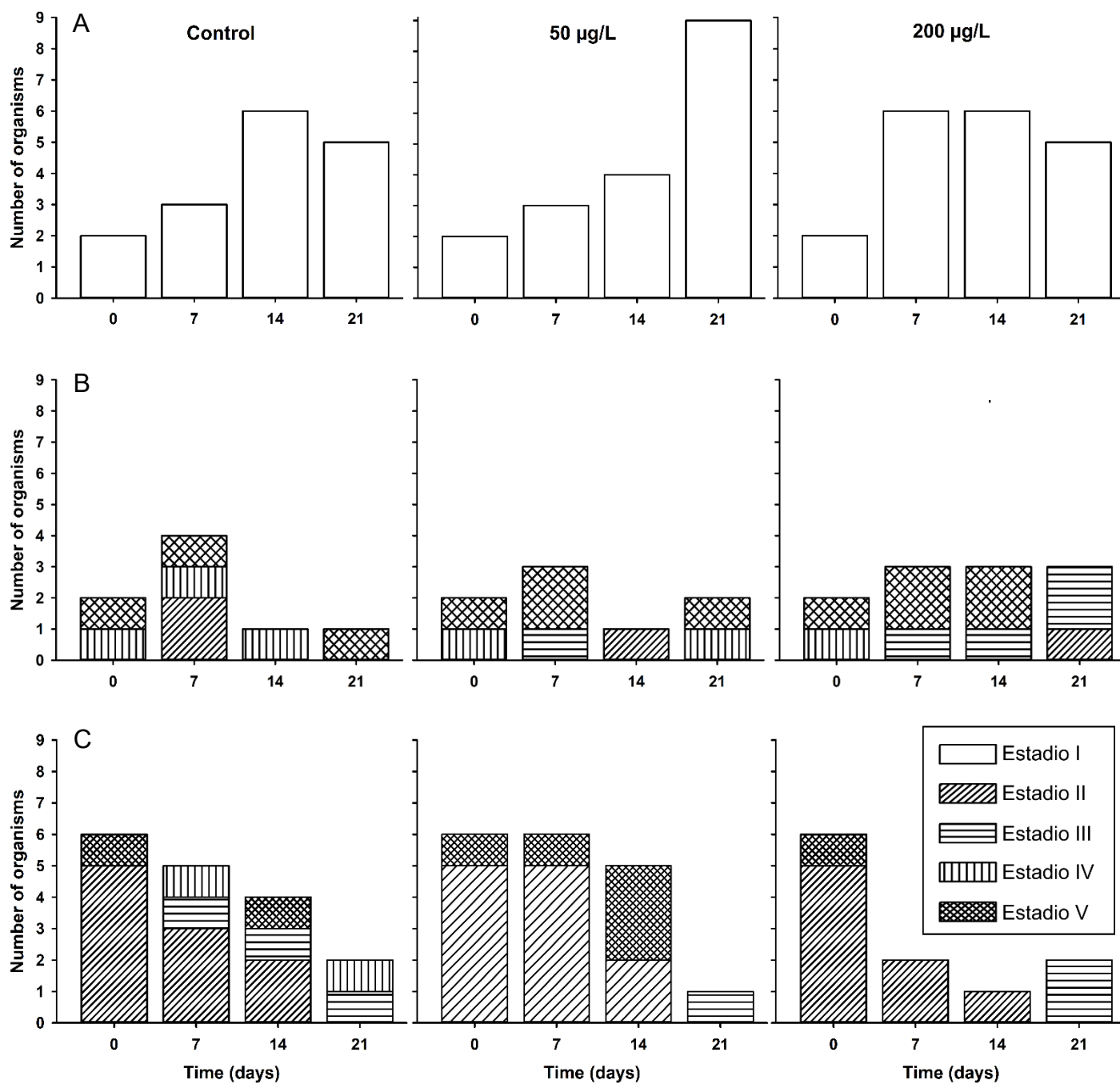
En el caso de las hembras (Fig. 14B) al comparar el tratamiento control, en donde las etapas de maduración gonadal estarían ocurriendo de manera “normal”, con el resto de los tratamientos se observa un desfase. El tratamiento de 50 y 200 µg/L están ligeramente retrasados, siendo esto más evidente en el tratamiento de 200 µg/L. En el día 21 tanto el tratamiento control como el de 50 µg/L presentan organismos en desove y post-desove mientras que el tratamiento de 200 µg/L están en gametogénesis y en madurez. También en el tratamiento de 200 µg/L se observan más hembras en post-desove (V) que en el resto de los tratamientos.

Los machos de *C. virginica* (Fig. 14C) iniciaron en gametogénesis (II) y post-desove (V), el tratamiento control presentó una mayor cantidad de estadios durante el periodo de muestro que los tratamientos con hidrocarburos, presentando el día 21 los estadios de madurez (III) y desove (IV). Un desfase respecto al control fue evidenciado en el día 21, ya que mientras en el control ya había organismos desovando (IV) en el tratamiento de 50 y 200 µg/L estaban solamente en el estadio de madurez (III).

Lo anterior podría indicar un efecto de los hidrocarburos en la maduración gonadal de *C. virginica*. Frouin et al. (2007) mencionan que la exposición a hidrocarburos puede provocar disfunción en la síntesis de esteroides sexuales, siendo considerados como disruptores endocrinos en algunos bivalvos como *Chlamys farreri* (Zhang et al., 2012)



además podrían inhibir el desarrollo de células germinales y la maduración gonadal en machos de *Perna viridis*, (Song et al., 2016).



**Figura 14. Número de organismos por tratamiento (Control, 50 y 200 µg/L) y tiempo de muestreo (0, 7, 14 y 21 días). A) Indiferenciados, B) Hembras y C) Machos. Sin relleno = estadio I, líneas diagonales = estadio II, líneas horizontales = estadio III, líneas verticales = estadio IV y rombos = estadio V.**

## **6.5 Análisis transcriptómico de organismos indiferenciados**

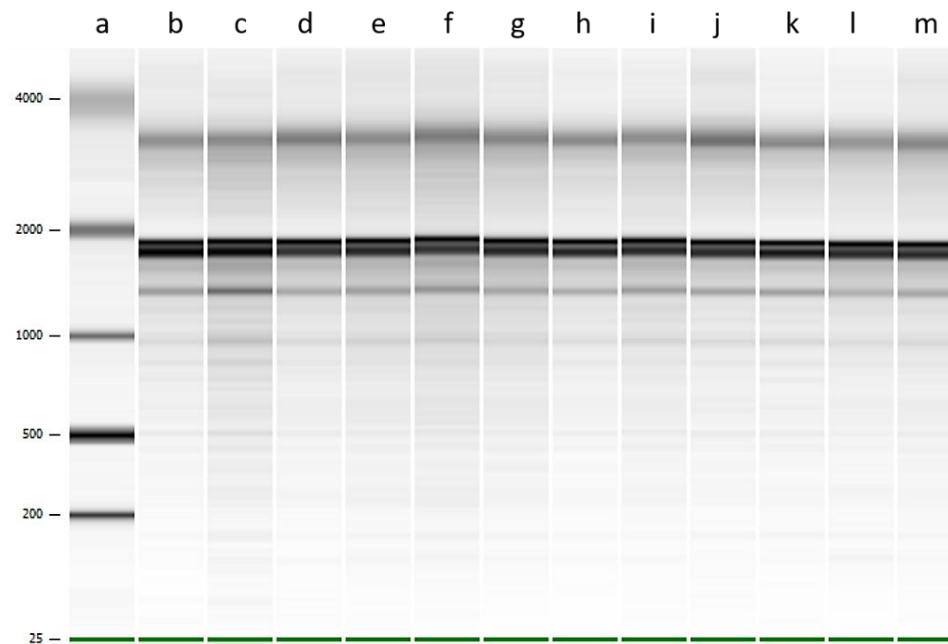
Fueron utilizados organismos indiferenciados para evitar que el sexo y estadio reproductivo tuvieran algún efecto sobre la expresión diferencial de genes relacionados con la maduración gonadal (Dheilly et al., 2012).

### **6.5.1 Bibliotecas genómicas de organismos indiferenciados**

Las muestras de RNA utilizadas para la elaboración de las librerías se muestran en la figura 15, todas las muestras tuvieron valores de RIN (RNA integrity number) > 6 por lo que fueron aptas para ser utilizadas. Un valor de RIN para una muestra de RNA íntegro es de 10 (Mueller et al., 2016), este valor es resultado de una relación entre las subunidades ribosomales 18S y 28S.

Se considera que el ARN es de buena calidad cuando tanto las bandas como los picos de las subunidades ribosomales 18S y 28S están bien definidos, y cuando la intensidad del pico de la subunidad 28S es más fuerte que la de la subunidad 18S (Gayral et al., 2011). A pesar de que esta relación de las subunidades ribosomales tiene un papel importante para la determinación de la integridad de una muestra de RNA, no en todos los organismos es aplicable (Mueller et al., 2016).

En los moluscos ocurre un “rompimiento oculto” en la subunidad 28S (Gayral et al., 2011), lo que hace que haya una migración de esta parecida a la de la subunidad 18S y esto no necesariamente puede significar degradación en el RNA de la muestras (Dheilly et al., 2011).



**Figura 15. RNA de las muestras a utilizar para realizar las librerías genómicas**

Los fragmentos de DNA complementario (cDNA) obtenidos para la realización de las bibliotecas genómicas se muestran en la figura 16. El tamaño de estos fragmentos se encuentra dentro de un rango de 350 – 500 pb.

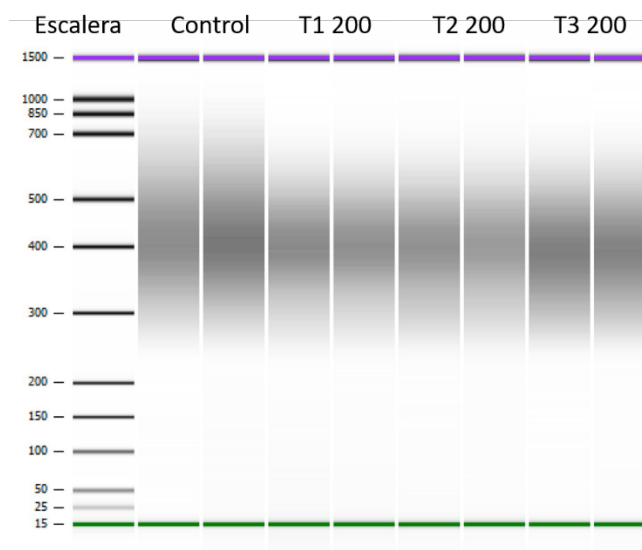


Figura 16. Bibliotecas genómicas de gónada de organismos indiferenciados de *C. virginica*.

### 6.5.2 Análisis transcriptómico

Se generó el transcriptoma de la gónada de *Crassostrea virginica* expuesta a hidrocarburos bajo condiciones de laboratorio. La secuenciación generó un total de 89,679,436 lecturas paired-end, en un rango de longitud de 65 a 77 pb con %GC de 44 a 49. Del total un  $93 \pm 3$  % (83,401,875 lecturas) de lecturas quedaron después del corte de adaptadores y secuencias de mala calidad. El 93 % de las lecturas tuvieron un valor de calidad arriba de Q30, lo que indica que por cada mil bases se tenía error en el acomodo de una base. La mayor cantidad de lecturas generadas correspondió al tratamiento T3. Las lecturas pre-procesadas fueron mapeadas contra el genoma de *C. virginica*, PhiX y la base de datos Univec (Tabla 7).

Tabla 7. Lecturas pre-procesadas (mapeadas contra *C. virginica*, PhiX y Univec).

Librerías	Secuencias crudas	Procesadas	<i>C. Virginica</i>	(Percentage change)	PhiX (%)	Univec (%)
T0_S1	3,604,148.0	3,224,371.0	614,387.0	81	0.0	0.001
T0_S1	3,604,148.0	3,224,371.0	697,112.0	78	0.0	0.003
T0_S2	6,744,111.0	6,246,041.0	970,413.0	84	0.0	0.001
T0_S2	6,744,111.0	6,246,041.0	982,554.0	84	0.0	0.002
T1_S1	6,219,475.0	5,727,534.0	1,232,238.0	78	0.0	0.002
T1_S1	6,219,475.0	5,727,534.0	1,365,495.0	76	0.0	0.003
T1_S2	4,663,149.0	4,394,675.0	974,117.0	78	0.0	0.001
T1_S2	4,663,149.0	4,394,675.0	983,189.0	78	0.0	0.001
T2_S1	6,140,488.0	5,689,568.0	1,146,683.0	80	0.0	0.001
T2_S1	6,140,488.0	5,689,568.0	1,281,460.0	77	0.0	0.002
T2_S2	4,586,805.0	4,339,490.0	858,466.0	80	0.0	0.001
T2_S2	4,586,805.0	4,339,490.0	866,868.0	80	0.0	0.001
T3_S1	6,616,281.0	6,129,752.0	1,331,283.0	78	0.0	0.001
T3_S1	6,616,281.0	6,129,752.0	1,476,043.0	76	0.0	0.002
T3_S2	6,265,261.0	5,884,884.0	1,386,677.0	76	0.0	0.000
T3_S2	6,265,261.0	5,884,884.0	1,401,531.0	76	0.0	0.001
<b>Media</b>	<b>5,604,964.8</b>	<b>5,204,539.4</b>	1,098,032.3	79	0.0	0.001
<b>Mediana</b>	<b>6,140,488.0</b>	<b>5,689,568.0</b>	1,098,032.3	78	0.0	0.001
<b>SD</b>	<b>1,116,407.8</b>	<b>1,048,023.3</b>	266,073.9	3	0.0	0.001
<b>Total</b>	89,679,436.0	93				

El transcriptoma ensamblado con generó 89,214 genes putativos con 134,463 transcritos putativos. El tamaño promedio de los transcritos fue de 640 pb con un total de 101,358,001 bases ensambladas.

En la secuenciación de gónada de hembras y machos de *Patinopecten yessoensis* Yang et al. (2016) obtuvieron 83,953,880 lecturas de dos librerías, de las cuales al pasar los filtros de calidad quedaron el 97.7% (81,986,898). Además, se ensamblaron con Trinity 29,897 unigenes con un % de GC de 39.22 con una longitud promedio de 479.14 bp (Yang et al., 2016), no mencionan que secuenciador se utilizó.

En la figura 18 se muestran los principales procesos identificados por ontología génica en la gónada de organismos indiferenciados de *Crassostrea virginica*.

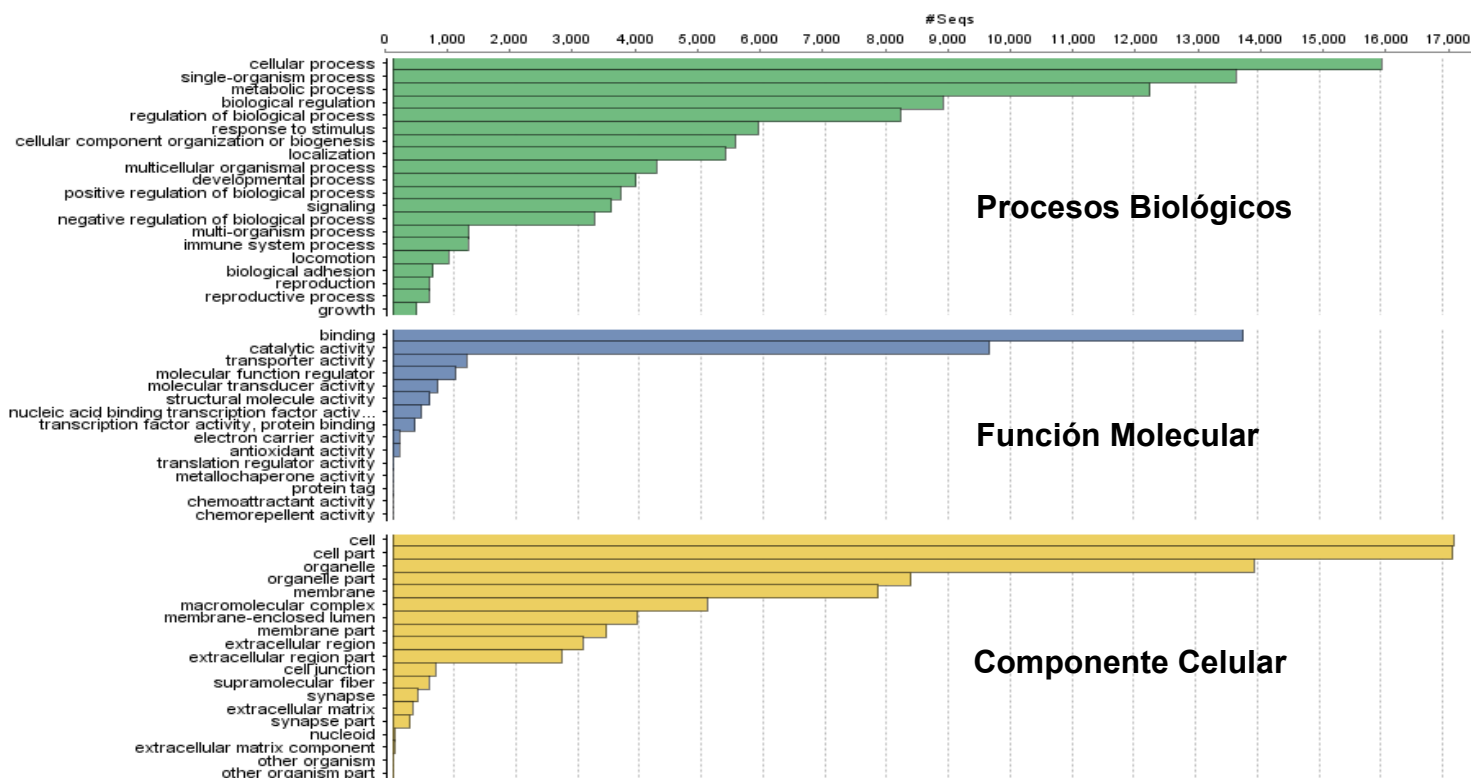


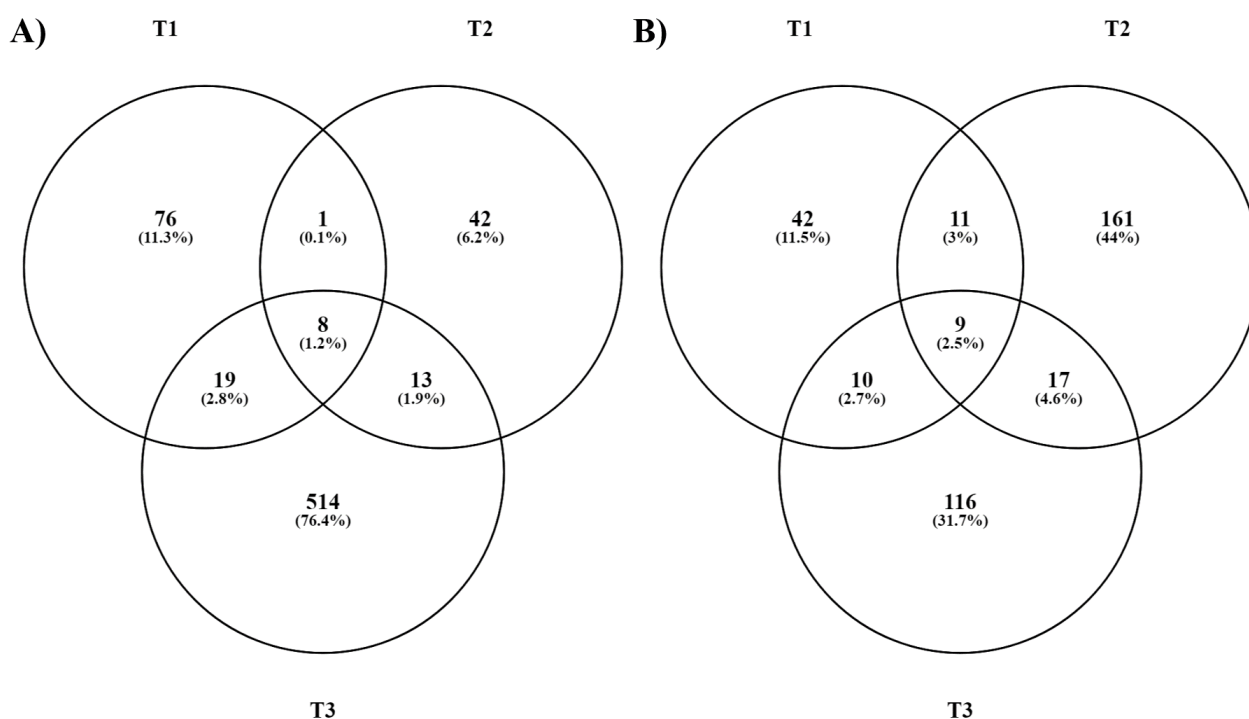
Figura 18. Clasificación por ontología génica de los transcritos identificados en la gónada de organismos indiferenciados de *C. virginica*.

### 6.5.3 Efecto de los hidrocarburos sobre la transcripción de genes en la gónada de organismos indiferenciados.

Un total de 673 genes fueron sobre-expresados en el periodo experimental. De estos, 104 genes sobre-expresados fueron observados exclusivamente a los 7 días (T1), 64 genes a los 14 días (T2) y 554 genes a los 21 días de exposición a hidrocarburos (Fig. 16A). También fueron observados 8 genes con sobre-expresión en los tres periodos de muestreo (Fig. 19A).

Respecto a los genes sub-expresados, se observaron un total de 366 durante los 21 días de exposición a hidrocarburos. De estos, 42 fueron exclusivos del T1, 161 del T2 y 116 del T3, así como 9 compartidos en los tres periodos de muestreo (Fig. 19B).

Fueron observados una mayor cantidad de genes sobre-expresados con respecto a los genes sub-expresados encontrados en este estudio, lo opuesto a los resultados reportados por Deng et al. (2014) en machos de *Chlamys farreri* expuestos a benzo[a]pireno, y en *Saccostrea glomerata* expuesta a pireno y fluroanteno (Ertl et al., 2016).



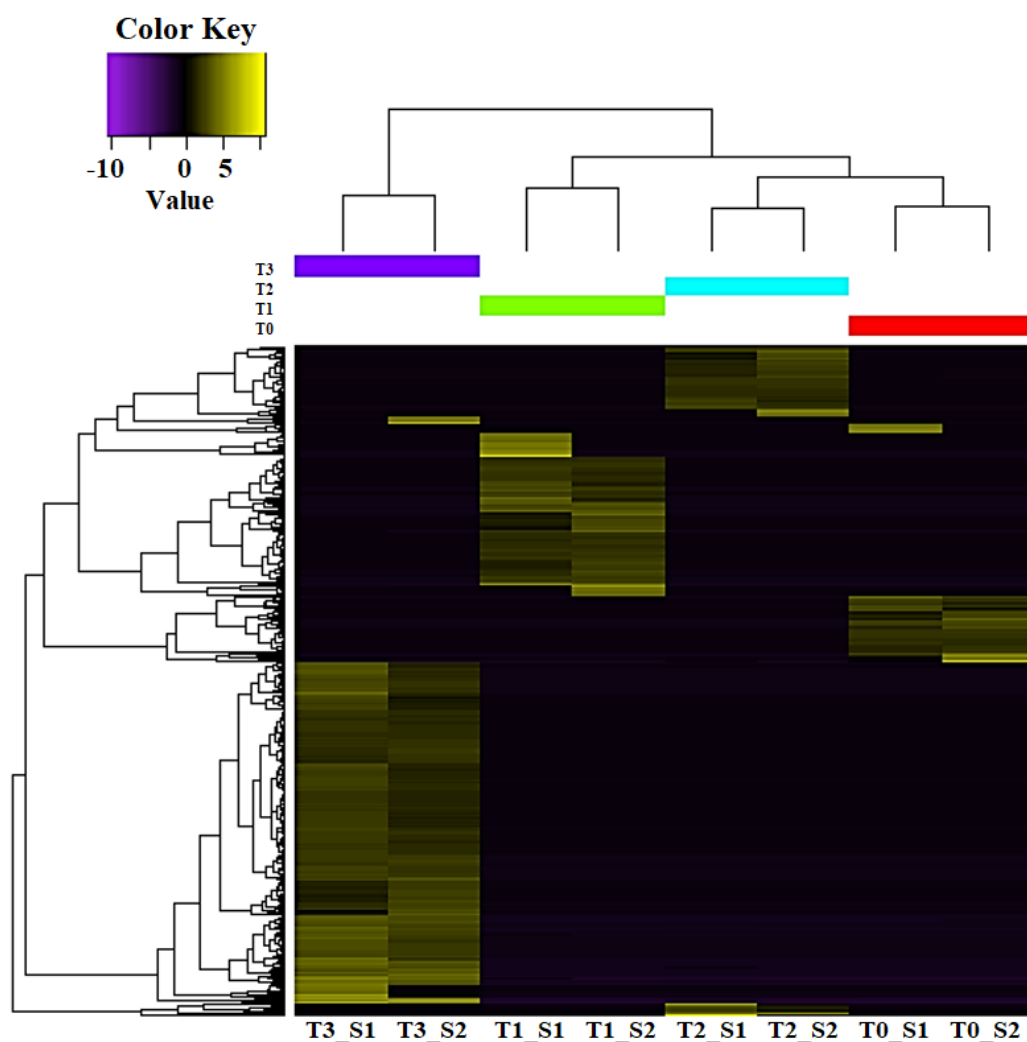
**Figura 19.** Diagrama de Venn en el que se muestran A) genes sub-expresados y B) genes sobre-expresados en los tres tiempos de muestreo respecto al control. T1, 7 días; T2, 14 días y T3, 21 días.

En el heatmap (Fig. 20) se muestran los grupos de genes basado en sus niveles de expresión (sobre y sub-expresión). En dendrograma de la parte superior separa en dos grandes grupos los tratamientos del presente trabajo. En el primer grupo se encuentra el T3 (21 días de exposición a hidrocarburos) y en el segundo el T0 (control), T1 (7 días de exposición) y T2 (14 días de exposición). Lo que nos indica que hay una mayor cercanía entre estos últimos tres.

Algo que resalta es que un grupo de genes que esta sobre-expresado en el T0 se sub-expresa en los tres tratamientos de exposición a hidrocarburos. Lo que nos indica que este grupo está siendo afectado directamente por la mezcla de hidrocarburos (Fig. 20).

En el T3 un gran grupo esta sobre-expresandose, mientras que en los otros tres tratamientos esta sub-expresado. Otra particularidad que se puede apreciar en el Heatmap es que cada tratamiento posee un grupo propio de genes sobre-expresados (Fig. 20).





**Figura 20. Heatmap del análisis de patrones de expresión génica en el tratamiento control (sin hidrocarburos) y los tres tiempos de muestreo con su réplica de secuenciación (T1, 7 días; T2, 14 días; T3, 21 días; a, replica 1; b, replica 2) con 200 µg/L de hidrocarburos. Arriba y en el lado izquierdo se muestra el rango del intervalo, los colores amarillos indican sobreexpresión y los azules sub-expresión.**

Se hizo un análisis de enriquecimiento de los de genes con expresión diferencial (sub-expresados y sobre-expresados) en los tres tiempos de muestreo. En todos los casos, los niveles de expresión son respecto al control. En el tiempo T1 (Fig. 21), se observó que los genes sub-expresados estuvieron relacionados con el sistema inmune (repuesta

a otros organismos, a estímulos bióticos externos y a bacterias) y metabolismo de macromoléculas. Siendo la mayor cantidad de transcritos observados pertenecientes a la clasificación de procesos biológicos.

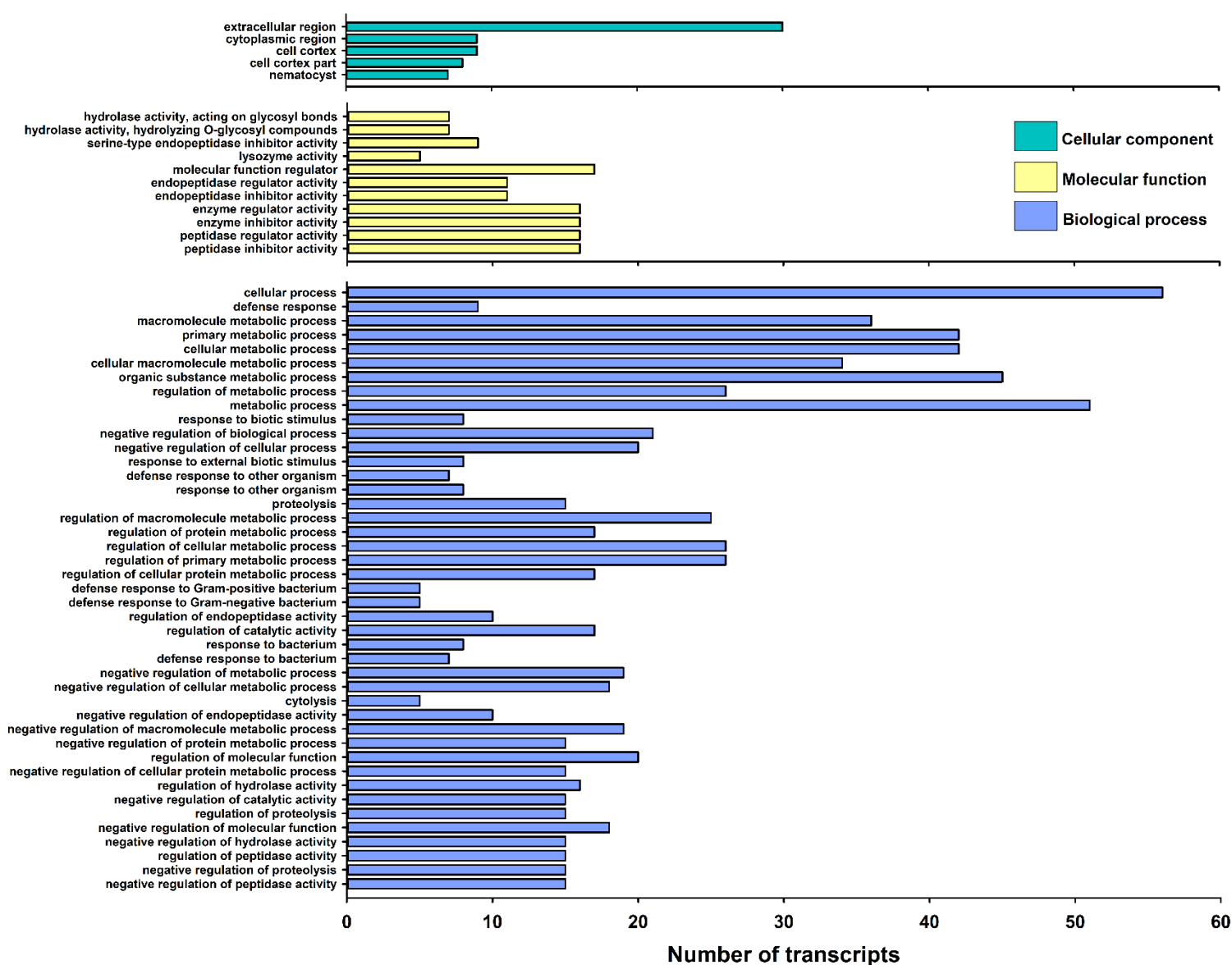
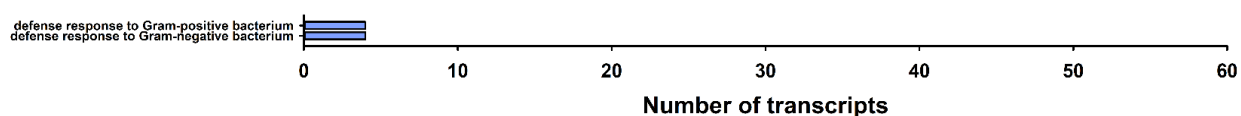


Figura 21. Categorías de ontología genética (GO) (enrichedGeneontology(GO)categories) enriquecida con genes expresados diferencialmente (sub-expresados) en la gónada de *C. virginica* comparando el grupo expuesto a 200 µg/L de hidrocarburos en el T1 (7 días) con respecto al control

(sin hidrocarburos). Cada color es una de las categorías, aqua = componente celular, amarillo = función molecular y azul = procesos biológicos.

Mientras que los genes sobre-expresados (Fig. 22) pertenecieron a la clasificación de procesos biológicos solamente y estuvieron asociados al sistema a inmune, correspondieron a defensa contra bacterias Gram positivas y Gram negativas.



**Figura 22.** Categorías de ontología genética (GO) enriquecida con genes expresados diferencialmente (sobre-expresados) en la gónada de *C. virginica* comparando el grupo expuesto a 200 µg/L de hidrocarburos en el T1 (7 días) con respecto al control (sin hidrocarburos). azul = procesos biológicos.

En el tiempo T2, los genes sub-expresados se relacionaron con el sistema inmune, feromonas, metabolismo de carbohidratos y lípidos (Fig. 23). Mientras que los genes sobre-expresados se relacionaron con defensa a bacterias (al igual que en el T1) y con la respuesta a estímulos bióticos externos (Fig. 24).

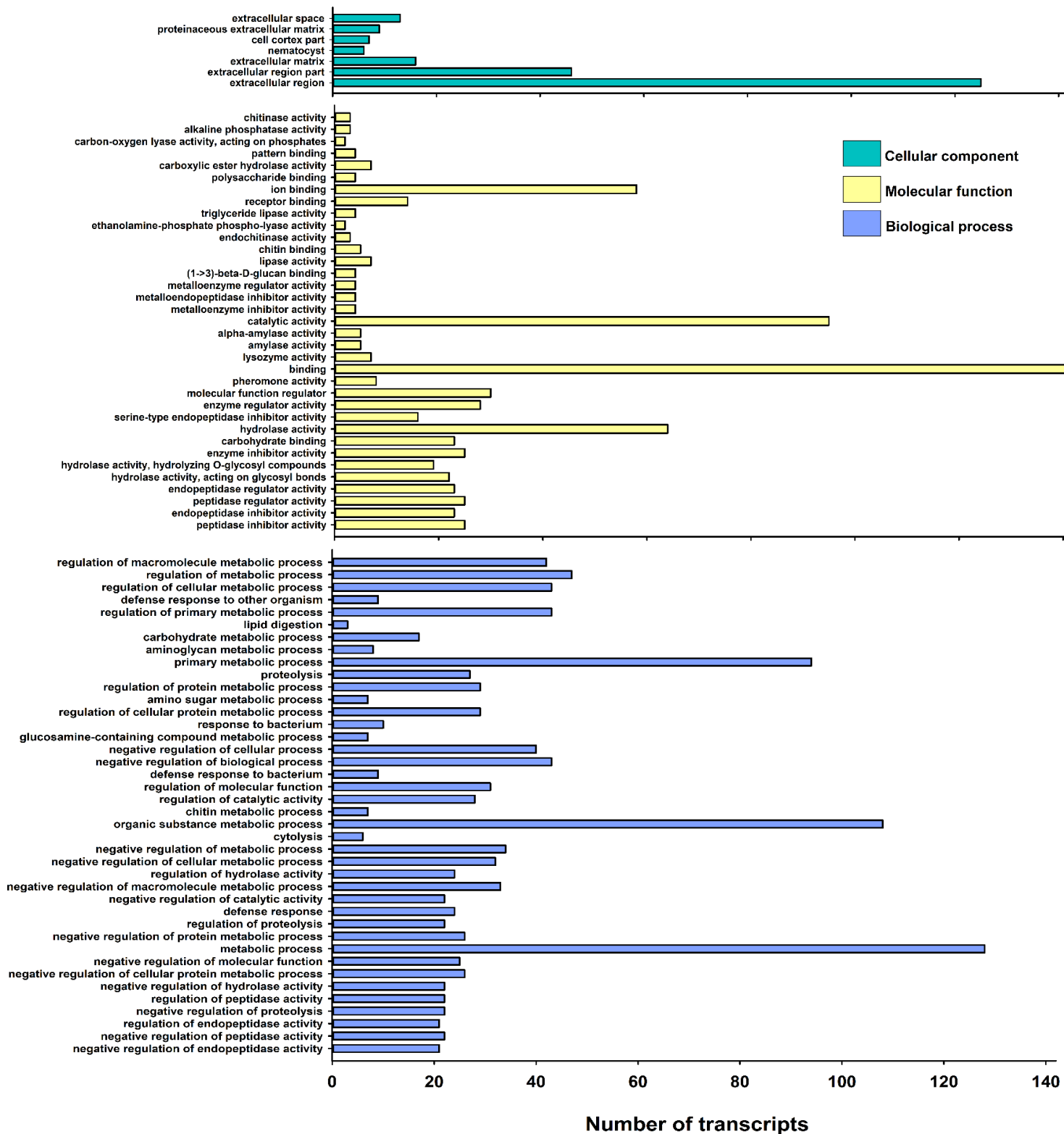


Figura 23. Categorías de ontología genética (GO) enriquecida con genes expresados diferencialmente (sub-expresados) en la gónada de *C. virginica* comparando el grupo expuesto a 200 µg/L de hidrocarburos en el T2 (14 días) con respecto al control (sin hidrocarburos). Cada color

es una de las categorías, aqua = componente celular, amarillo = función molecular y azul = procesos biológicos.

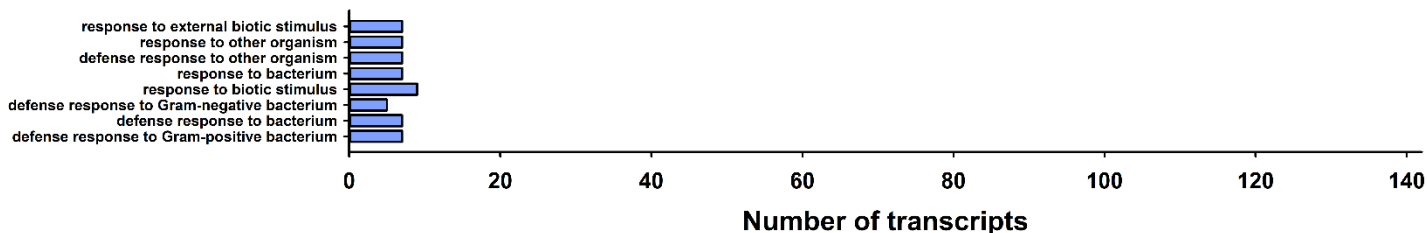


Figura 24. Categorías de ontología genética (GO) enriquecida con genes expresados diferencialmente (sobre-expresados) en la gónada de *C. virginica* comparando el grupo expuesto a 200 µg/L de hidrocarburos en el T2 (14 días) con respecto al control (sin hidrocarburos). azul = procesos biológicos.

Para el tiempo T3, los grupos de genes sub-expresados estuvieron relacionados con feromonas y metabolismo de proteínas (Fig. 25). La cantidad de transcritos sub-expresados fue menor que el T1 y T2.

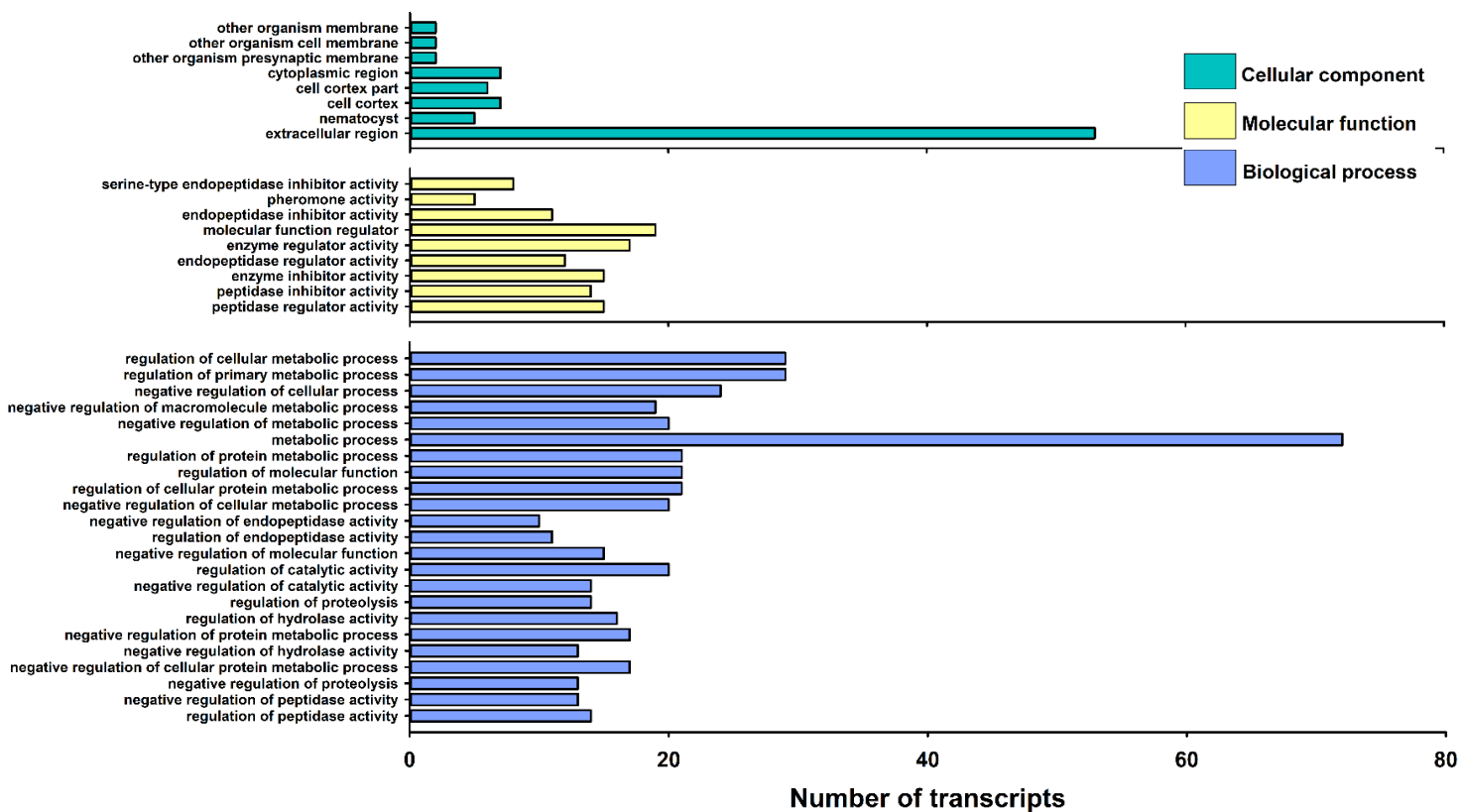


Figura 25. Categorías de ontología genética (GO) enriquecida con genes expresados diferencialmente (sub-expresados) en la gónada de *C. virginica* comparando el grupo expuesto a 200 µg/L de hidrocarburos en el T3 (21 días) con respecto al control (sin hidrocarburos). Cada color es una de las categorías, aqua = componente celular, amarillo = función molecular y azul = procesos biológicos.

A diferencia de los tiempos T1 y T2, donde los genes sobre-expresados estuvieron relacionados con el sistema inmune, en el tiempo T3, los genes sobre-expresados se relacionaron con el metabolismo de amidas, péptidos y vitaminas (Fig. 26).

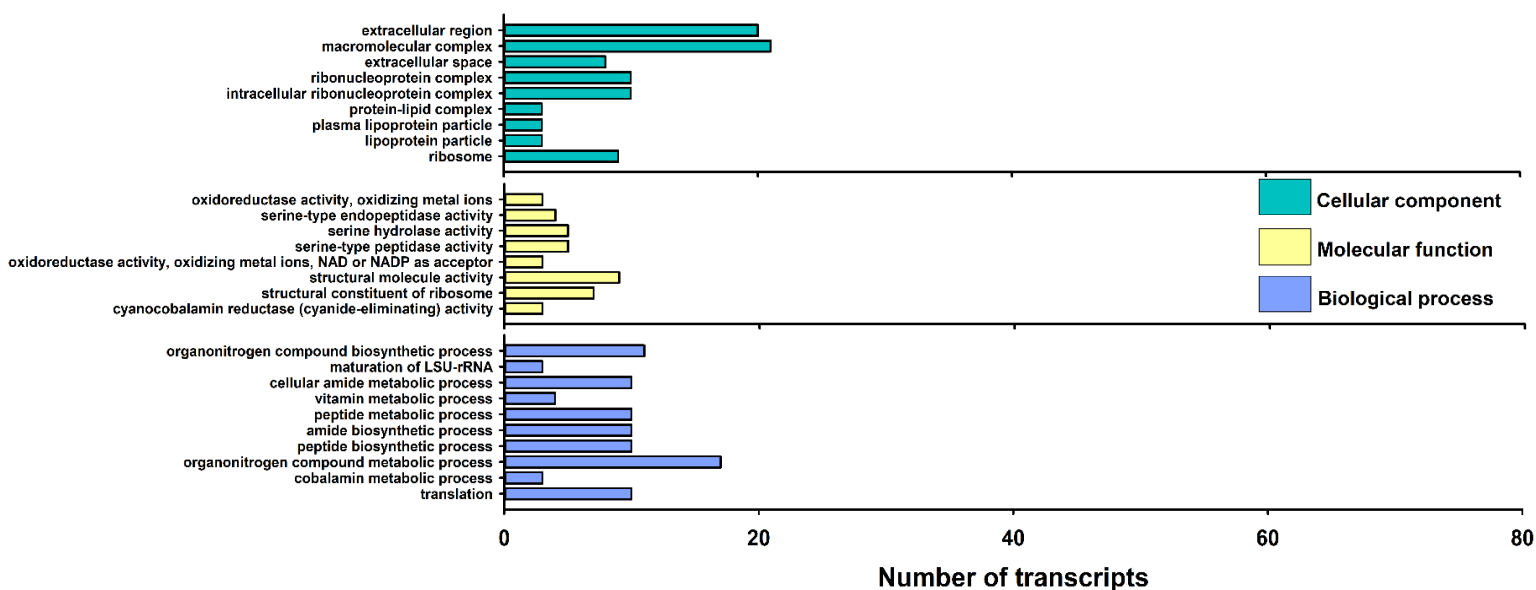


Figura 26. Categorías de ontología genética (GO) enriquecida con genes expresados diferencialmente (sub-expresados) en la gónada de *C. virginica* comparando el grupo expuesto a 200 µg/L de hidrocarburos en el T3 (21 días) con respecto al control (sin hidrocarburos). Cada color es una de las categorías, aqua = componente celular, amarillo = función molecular y azul = procesos biológicos.

Fueron identificados genes con expresión diferencial que codifican para proteínas cuya función está relacionada con distintos procesos de la maduración gonadal y, en este caso, el desarrollo de la gónada de juveniles de *C. virginica* (Tabla 9). El análisis de expresión diferencial mostró que este grupo de genes se sub-expresó en los tratamientos T1, T2 y T3 respecto al control (T0).

Dentro de los procesos en los que están involucrados estos genes se encuentran, el metabolismo de carbohidratos con el gen STBD1 que está relacionado con el metabolismo de glucógeno, y se sabe que esta proteína prevalece en el tejido donde el glucógeno es almacenado como fuente de energía (Jiang et al., 2010). Los genes PCK1 y PCK2 los cuales están involucrados en la biosíntesis de carbohidratos (Hanson and Reshef, 1997), especialmente glucógeno, el cual es una de las principales reservas de energía que será destinada para maduración en *Crassostrea gigas* (Matus De la Parra et al., 2005). Relacionados con el metabolismo, catabolismo, almacenamiento y transporte de lípidos se encuentran LIPR1 (Kim et al., 2008), LIPH (Jin et al., 2002), SAP3 (Dondero et al., 2011) y FABP4 (Li et al., 2011), respectivamente. Las PLRPs (LIPR1 y LIPR2) tienen una mayor expresión en la gónada de hembras de *Patinopecten yessoensis* que en machos, además se ha observado una mayor expresión de estas lipasas en organismos en proceso de maduración que en organismos maduros o en desove (Kim et al., 2008). Lo que puede indicar que las lipasas tienen un papel importante en el metabolismo de lípidos asociados con la maduración de los ovocitos y vitelogénesis, con la maduración de la gónada femenina (Kim et al., 2008). Los lípidos, al igual que los carbohidratos, son una importante reserva energética usada por los bivalvos para la maduración gonadal (Barber and Blake, 1981). Otra proteína relacionada con los lípidos

es FABP4 (Fatty acid-binding protein, adipocyte), cuya función es la toma y uso de ácidos grasos (Li et al., 2011). En un estudio realizado con el cangrejo *Eriocheir sinensis*, se observó que su función está relacionada con el transporte de lípidos para la maduración de la gonada masculina (Li et al., 2011). En el caso de *Crassostres gigas*, se cree que tiene una función en la estimulación del desove (Lang et al., 2009).

También, se encontró un gen asociado con la feromona temptin (TEMPT), la cual ha sido reportada previamente como estimulante del apareamiento en otros moluscos como *Aplysia* y otras babosas marinas (Cummins et al., 2007; Cummins and Degnan, 2010).

Dos genes involucrados en la ruta del receptor de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRHr), reportado como exclusivo en la gónada de *C. gigas* (Rodet et al., 2005) fueron observados con expresión diferencial. Los genes asociados con el GnRHr fueron el P85A y M3K7 y fueron identificados con el software PANTHER (Mi et al., 2017).

Los genes ARSB y TSPO, relacionados con hormonas esteroideas (andrógeno y estrógenos) presentaron expresión diferencial. ARSB codifica para una enzima sulfatasa, la cual está relacionada con el metabolismo de estrógenos (Bhattacharyya and Tobacman, 2007), mientras que la TSPO se relaciona con la síntesis de hormonas esteroideas en general (Fan et al., 2012). En humanos la TSPO es sintetizada en tejidos endocrinos, lugar en donde son sintetizadas las hormonas esteroideas, el primer paso de la formación de esteroides (Fan et al., 2012). Adicionalmente, el gen CELB3B también se sub-expresó, este se relaciona con el metabolismo del colesterol, precursor de las hormonas esteroideas.



El gen AMY (sub-expresado en el T2 y relacionado con la asimilación de nutrientes) es otro gen que podría influir en la maduración de la gónada de *C. virginica*, Huvet et al. (2015) provocaron su disrupción con RNA de interferencia y observaron un retraso en la gametogénesis de *Crassostrea gigas*. El área de la gónada se redujo, así como el desarrollo de células germinales lo cual pudo deberse a una deficiencia en la absorción de nutrientes (Huvet et al., 2015).

Otros genes sub-expresados estuvieron relacionados con el desarrollo de células germinales tales como el DDX5 (Abdelhaleem, 2005), SOX (Yu et al., 2017), PPBT (Paranko and Pelliniemi, 1992), BGH3 (Dheilly et al., 2014) y FZD5 (Richards et al., 2002).

Se identificaron dos genes relacionados con las proteínas del huevo, IOVO (Demarchi et al., 2016) y OV71 (Bourin et al., 2011). OV71 es altamente expresado en el hígado y útero de gallinas, la expresión aumenta en el hígado durante la maduración sexual y disminuye en gallinas maduras (Bourin et al., 2011). La expresión de OV71 es sensible a estrógenos, es secretada en el hígado e incorporada en los folículos en desarrollo (Bourin et al., 2011). Esta proteína tiene una actividad antimicrobial, que puede servir de protección para el embrión durante su desarrollo extrauterino (Bourin et al., 2011).

**Tabla 8. Genes y proteínas relacionados con la maduración gonadal de *C. virginica*. Los espacios vacíos indican que el gen no presentó expresión diferencial respecto al control.**

Proceso	Gen	Proteína	T1 (7 días)	T2 (14 días)	T3 (21 días)
<b>Metabolismo de carbohidratos</b>	STBD1	Starch-binding domain-containing protein 1	Down		
	AMY	Alpha-amylase		Down	
	PCKG	Phosphoenolpyruvate carboxykinase			Down
<b>Metabolismo de lípidos</b>	LIPR1	Inactive pancreatic lipase-related protein 1		Down	
	LIPR2	Pancreatic lipase-related 2		Down	
	LIPH	Lipase member H		Down	
	SAP3	Ganglioside GM2 activator		Down	
	FABP4	Fatty acid-binding protein, adipocyte		Down	
<b>Feromona</b>	TEMPT	Temptin		Down	Down
<b>Relacionadas con la ruta metabólica del receptor de la GnRH</b>	P85A	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha		Down	Down
	M3K7	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7		Down	Down
<b>Relacionadas con hormonas esteroideas</b>	ARSB	Arylsulfatase B		Down	
	TSPO	Translocator protein		Down	
<b>Desarrollo de células germinales</b>	DDX5	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5		Down	
	SOX	Peroxisomal sarcosine oxidase			Down
	PPBT	Alkaline phosphatase, tissue-nonspecific isozyme		Down	
	BGH3	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3		Down	
	FZD5	Frizzled-5			Down
<b>Proteínas del huevo</b>	IOVO	Ovomucoid		Down	Down
	IOV7	Ovoinhibitor		Down	Down

Se sabe que algunos contaminantes (hidrocarburos, desechos de embarcaciones y descargas domésticas e industriales) pueden afectar el sistema nervioso de los moluscos bivalvos (Gagné et al., 2007), lugar desde donde da inicio la señalización para la maduración gonadal. Una hormona clave en el inicio de la maduración gonadal es la GnRH, la cual es sintetizada en el ganglio visceral (sistema nervioso) de *Crassostrea virginica* (Bigot et al., 2012). En este trabajo, dos genes relacionados con el GnRHR se sub-expresaron. Este receptor es activado por la GnRH, lo que nos indica que la señalización por la GnRH se vio afectada por los hidrocarburos.

Dos genes relacionados con hormonas esteroideas fueron sub-expresados, las cuales se sabe que tienen un papel importante en el control de la maduración gonadal de los moluscos (Croll and Wang, 2007). Estas hormonas tienen además una gran importancia en la diferenciación sexual (Kajiwara et al., 2006). También se observó la sub-expresión de genes que son estimulados por las hormonas esteroideas. Lo que nos indica que la exposición a hidrocarburos ocasionó una disrupción endocrina en *C. virginica*. Lo cual afectó negativamente la expresión de genes que están relacionados con el desarrollo de células germinales, así como la movilización de reservas energéticas para la maduración de las células reproductivas.

Gagné et al. (2007) observaron una disfunción en el sistema nervioso, así como un retraso en la gametogénesis de *Mya arenaria*, esto debido a la exposición a contaminantes (puertos y descargas domésticas).

Deng et al. (2014) identificaron ocho genes con expresión diferencial en la gónada de machos maduros de *Chlamys farreri* expuestos a benzo[a]pireno. Los genes observados por Deng et al. (2014) estuvieron relacionados con la maduración gonadal y fueron CYP3A (Cytochrome P450, family 3, subfamily A), IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein), CDK2 (Cyclin-Depend Kinase 2), HSP90 (Heat Shock Protein 90), 17 $\beta$ -HSD (17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase), E2SULT (Sulphotransferase), TSSK2 (Testis Specific Serine Kinase 2) y PDE5 (Phosphodiesterase 5). Todos, a excepción del IAP, fueron identificados en la gónada de *C. virginica*, sin embargo, no presentaron expresión diferencial. Lo anterior podría deberse a que los organismos utilizados en este estudio fueron indiferenciados y en el trabajo de Deng et al. (2014) los organismos fueron machos maduros.

En la Tabla 3 (ANEXO 2) se muestran el resto de los genes (diversos procesos fisiológicos) que tuvieron expresión diferencial en los tres tiempos de muestreo respecto al control. El grupo de genes que predominó fue el relacionado con el sistema inmune de *C. virginica* (24 %). Dentro de este grupo de 43 genes, solo cinco se sobre-expresaron mientras que el resto se sub-expresó. Diversos autores mencionan que la exposición a hidrocarburos puede ocasionar inmunosupresión en los moluscos bivalvos, lo que concuerda con lo observado en el presente trabajo (Fernley et al., 2000; Hannam et al., 2010). En *C. virginica*, Chu et al. (2002) determinaron que la exposición a sedimentos contaminados con hidrocarburos hizo más susceptibles a los organismos a la infección por *Perkinsus marinus*. Entre los genes sobre-expresados se encuentran los que codifican para Defensin-1 (en el T1 y T2), Defensin (T2), Lysozyme 1 (T2), Trypsase gamma (T3) y Chymotrypsin-like serine proteinase (T3). Xue et al. (2004) aislaron la

Lysozyme 1 en *C. virginica* y mencionaron que inhibe el crecimiento de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Los genes DEFI (Defensin) y DEF1 (Defensin-1), han sido reportados por participar en la respuesta al estrés en *C. virginica* (Jenny et al., 2002). La enzima Tryptase ha sido reportada como de respuesta del sistema inmune ante infecciones bacterianas en peces (Da'as et al., 2011), en bivalvos no ha sido descrita su función.

Otro grupo de genes de respuesta a la exposición a hidrocarburos observados fueron los de estrés oxidativo, todos los genes de este grupo se sub-expresaron respecto al control durante el periodo de muestreo (Tabla 3 S1). Tales genes fueron: Cathepsin L1 (CATL1), Cathepsin K (CATK), Cathepsin L (CATL), Cathepsin B (CTSB) y Cathepsin Y. Varios de estos indicadores de estrés fueron reportados como biomarcadores potenciales en un estudio de EST's (Expressed Sequence Tags) en hemocitos y embriones de *C. virginica* (Jenny et al., 2002). Los resultados de expresión génica en gónada de *C. virginica*, obtenidos como respuesta de la exposición a hidrocarburos en este estudio, concuerdan con aquellos obtenidos por Jenny et al. (2002) y confirman la función de los marcadores de estrés mencionados arriba. Otro grupo importante de genes relacionados con la respuesta a contaminantes estuvo conformado por la Catalasa (CAT) y Glutathione S-Transferasa (GST). CAT es un gen de respuesta al estrés oxidativo (Blanchette et al., 2007) y estuvo sub-expresado en los tiempos T1 y T2. Los miembros de la familia GST están involucrados en la conjugación del glutathione con los compuestos xenobióticos y la defensa contra el daño oxidativo del DNA y lípidos (Blanchette et al., 2007). Miembros de esta familia fueron sub-expresados en el presente estudio, Glutathione S-transferase omega-1 (GSTO1) en los tiempos T1 y T2, mientras

que Glutathione S-transferase 3 (GSTA3) en el tiempo T3. La sub-expresión de CAT y de miembros de la familia GST ha sido reportada en *Crassostrea brasiliensis* expuesta a phenanthrene (Lüchmann et al., 2014) y *Chlamys farreri* expuesta a benzo[a]pyrene (Cai et al., 2014). CAT y GST han sido propuestos como potenciales bioindicadores de contaminación en especies acuáticas, tales como los moluscos, debido a que pueden ser inducidos o inhibidos por ciertos contaminantes en el medio marino (Bebianno et al., 2004; Jenny et al., 2016; Vidal and Narbonne, 2000).

Para el tiempo T3 se observa la mayor cantidad de genes con sobre-expresión, dentro de este grupo de genes el que presento la mayor cantidad de sobre-expresados fue el de las proteínas ribosomales (Tabla 12 Anexo1). La mayoría de los genes sobre-expresados estuvieron relacionados con la síntesis de proteínas y vitaminas, lo que nos podría indicar que el organismo empieza a recuperarse del estrés que generó la exposición a hidrocarburos (200 µg/L) durante dos semanas (Tabla 12 Anexo1). Mediante el análisis en la base de datos KEEG, se identificaron rutas metabólicas de la gónada de *C. virginica* relacionadas con la maduración gonadal, pero que no se vieron afectadas por la exposición a hidrocarburos. Dentro de estas rutas están las de degradación de ácidos grasos, biosíntesis de ácidos grasos, biosíntesis de esteroides, degradación de esteroides, metabolismo de glucógeno y biosíntesis de hormonas esteroideas. El hecho de que estas rutas metabólicas no hayan sido afectadas por la exposición a hidrocarburos, podría deberse a que no estuvieron totalmente activas, considerando la condición indiferenciada de la gónada y, por lo tanto, los organismos no iniciaban con el proceso de maduración.

A manera de resumen en la tabla 9 se muestran los procesos anteriormente mencionados como afectados por la exposición a hidrocarburos. Lo más destacable de este resumen es que en el T2 es cuando se observa el mayor efecto sobre el proceso de maduración, sistema inmune y de estrés oxidativo, lo cual coincide con la mayor acumulación de hidrocarburos, tanto alifáticos como policíclicos aromáticos. Lo que nos podría indicar de un mayor efecto negativo en conjunto.

**Tabla 9. Resumen del efecto de hidrocarburos en la gónada de *C. virginica* (-- = sin efecto; \* = efecto bajo; \*\* = efecto medio; \*\*\* = efecto alto).**

	Control	T1 (7 días)	T2 (14 días)	T3 (21 días)
<b>Acumulación de AHs</b>	--	*	***	**
<b>Acumulación de PAHs</b>	--	***	***	***
<b>Efecto negativo en la maduración de la gónada</b>	--	--	***	**
<b>Inmunosupresión</b>	--	*	***	**
<b>Estrés oxidativo</b>	--	**	***	*

## 6.6 Análisis de expresión de genes mediante PCR cuantitativo en tiempo real.

### 6.6.1 Estandarización de genes de referencia

Se estandarizaron mediante PCR punto final los genes de referencia seleccionados, TSPO, ZN35, RPL19, RPS24, UBA6, KS6A1, NATD1, RPE, UBP37 y UBA6 (Fig. 27). Se realizó un gradiente de temperatura de 58 a 64 °C y se determinó que la temperatura de alineamiento óptima era de 60 °C (en la sección 2.8.4 de metodología se describen las condiciones bajo las cuales se realizó). De los genes estandarizados se seleccionaron seis para los análisis de estabilidad, estos fueron TSPO, RPL19, RPS24, KS6A1, NATD1 y UBP37.

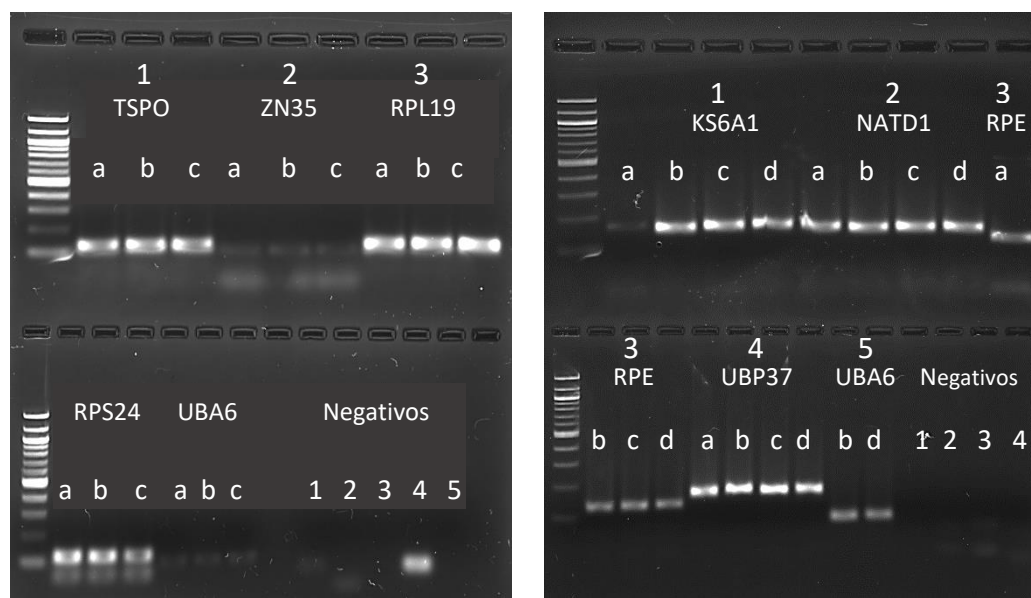


Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa del gradiente de temperaturas para estandarizar los genes de referencia seleccionados. a) 58 °C; b) 60 °C; c) 62 °C; d) 64 °C.



### 6.6.2 Estandarización de genes de interés

La estandarización de los genes de interés se realizó de la misma manera que la de los genes de referencia y que se describe en la sección 2.8.4 de la metodología. Las bandas obtenidas de los genes de interés estandarizados se muestran en la figura 28.

De los genes de interés estandarizados se seleccionaron ocho para los análisis de expresión por PCR en tiempo real, estos fueron STDB1, DDX5, M3K7, FZD5, P85A, TEMPT, LPRI1 y ARSB. Los cuales están involucrados en los distintos procesos de maduración de *C. virginica*.

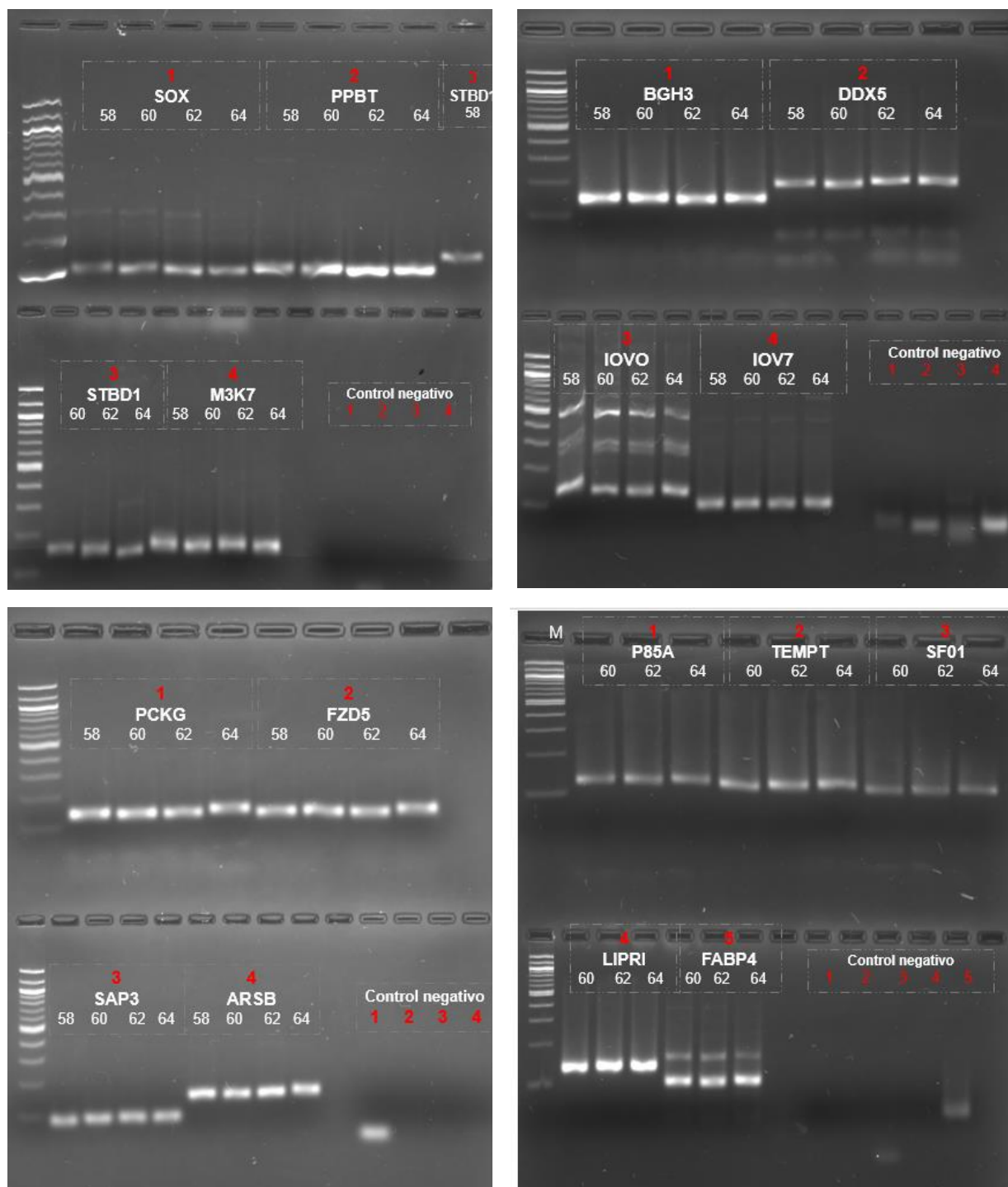


Figura 28. Genes de interés estandarizados por PCR punto final.

### 6.6.3 Análisis de curvas de eficiencia

Se obtuvieron las curvas de eficiencia para los genes de referencias y para los genes de interés, estas se muestran en las tablas 10 y 11. Los valores de eficiencia para los genes de referencia estuvieron entre 91.6 – 104.7, correspondiendo a los genes RPL19 y NATD1 respectivamente. En el caso de los valores de eficiencia para los genes de interés, estos estuvieron entre 92.5 y 103.9, correspondiendo al M3K7 y FZD5 respectivamente.

**Tabla 10. Valores de las curvas de eficiencia de los genes de referencia**

Gen	Eficiencia	R <sup>2</sup>	Temp de disociación
KS6A1	100.8	0.987	83
NATD1	104.7	0.995	80.0 – 80.5
RPL19	91.6	0.991	84.5 – 85.0
RPS24	96.0	0.987	82.0
TSPO	103.1	0.997	84.5 – 85.0
UBP37	94.0	0.985	82.5 – 83.0

En el caso de los genes de interés los valores más bajos de expresión fueron observado en el gen P85A con una variación de Cq entre 29.51 – 34.23 y en el STDB1 con una variación entre 28.93 – 36.26.

**Tabla 11. Valores de las curvas de eficiencia de los genes de interés**

Gen	Cq	Eficiencia (%)	R <sup>2</sup>	Temp de disociación (°C)
ARSB	26.86 – 34.04	93.9	0.996	84.0 – 84.5
DDX5				
FZD5	25.75 – 30.27	103.9	0.998	86.5 – 87.0
LIPR1	27.10 – 34.21	96.6	0.990	86.5 – 87.0
M3K7	26.59 – 33.97	92.5	0.993	78.5

<b>P85A</b>	29.51 – 34.23	97.6	0.995	87.5
<b>STDB1</b>	28.93 – 36.26	96.8	0.989	85.0
<b>TEMPT</b>	27.63 – 35.05	97.2	0.969	85.5

#### 6.6.4 Graficas de expresión de los genes de interés

En la figura 29 se observa la expresión relativa de los genes M3K7, P85A, FZD5, DDX5, TEMPT. En todos los casos se observa una disminución significativa respecto al control en todos o algunos de los tiempos de muestreo. Dos de estos genes, el M3K7 y P85A están relacionados con la ruta del GnRHR y en ambos se observa una disminución en los tres tiempos de muestreo respecto al control (Fig. 29 A y 29B). Dos de los genes están relacionados con el desarrollo de células germinales, el FZD5 y DDX5 (Fig. 29C y 29D), y en ambos se observa una disminución hacia el T3, así como en los niveles de expresión del gen de la feromona temptina (TEMPT, Fig. 29D). Lo que nos estaría indicando que la maduración se está retardando debido a una disrupción en la señalización para la madurez reproductiva de la gónada de *C. virginica*.

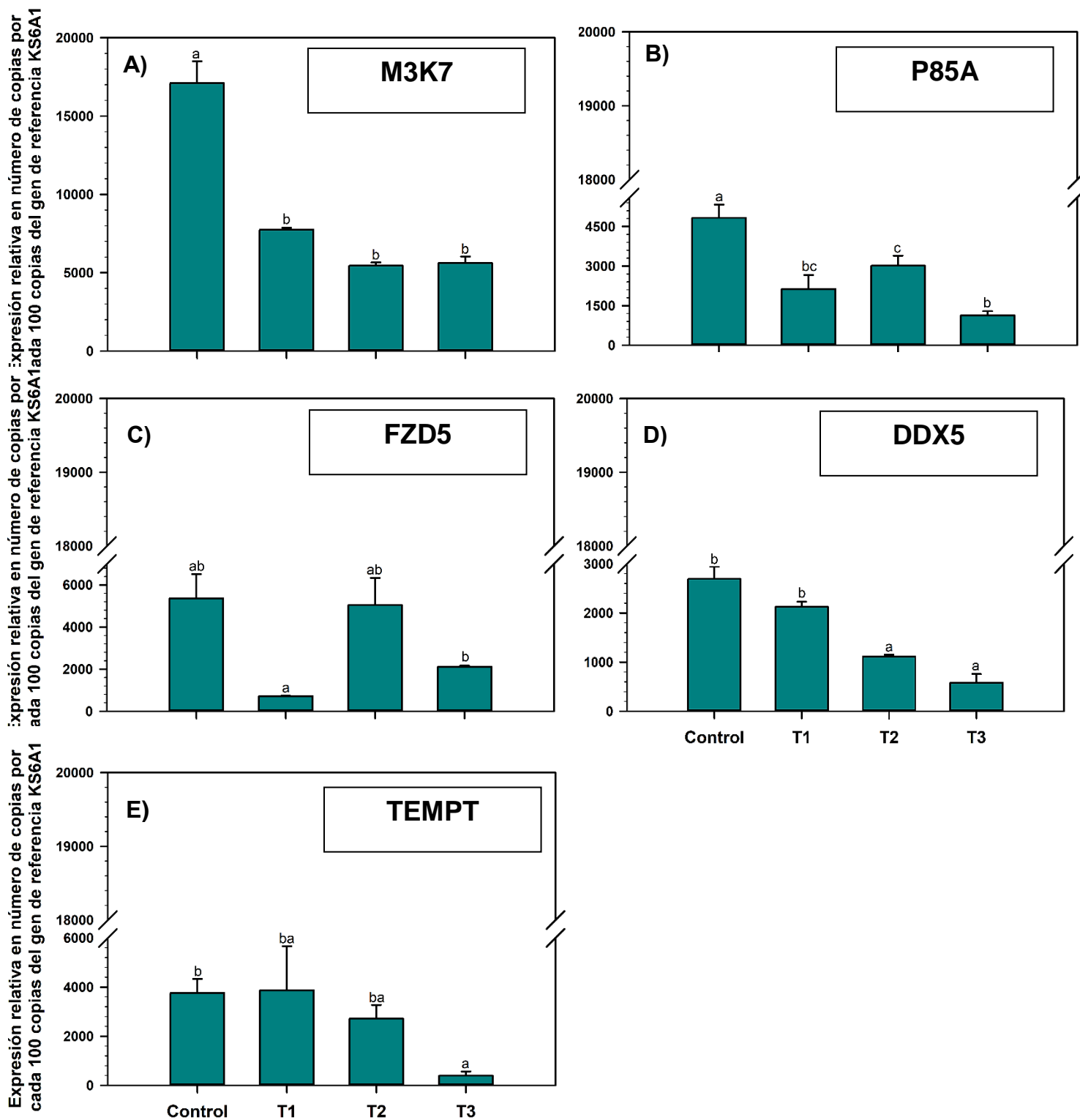


Figura 29. Análisis de expresión diferencial de los genes de interés A) M3K7; B) P85A; C) FZD5; D) DDX5; E) TEMPT con el gen de referencia KS6A1.

## 7 CONCLUSIONES

1. Hay una tendencia a la acumulación de PAHs en el tejido blando de *C. virginica*.
2. A nivel histológico se evidenció un posible efecto de los hidrocarburos sobre el ciclo de maduración gonadal de *C. virginica*. Se observó un retraso en la maduración de los organismos en el T3 que estuvieron expuestos a 200 µg/L respecto al control.
3. Bajo las condiciones experimentales en las que se realizó este trabajo y a la preservación de las muestras para el análisis histológico, no es posible evidenciar daño en el tejido gonadal ocasionado por la exposición a hidrocarburos.
4. Se evidenció el efecto de los hidrocarburos en la maduración gonadal de *C. virginica*, con la sub-expresión de 22 genes involucrados en distintas etapas de este proceso.
5. La exposición a hidrocarburos causa disfunción endocrina en *C. virginica*. Aparentemente se afecta la señalización de la GnRH y con esto la síntesis de hormonas esteroideas que a su vez deberían estimular la movilización de reservas energéticas e inducir el desarrollo de las células reproductivas.
6. La exposición a una concentración de 200 µg/L de hidrocarburos causa inmunosupresión en *C. virginica*. Además de una expresión diferencial de genes de respuesta a estrés, podrían ser utilizados como biomarcadores de contaminación por hidrocarburos en la gónada de *C. virginica*. Los genes son: CAT (Catalase), GSTO1 (Glutathione S-transferase omega-1), GSTA3

(Glutathione S-transferase 3), MRC2 (C-type mannose receptor), CATL1 (Cathepsin L1), CATK (Cathepsin K) y CATL (Cathepsin L).

Se observó un efecto negativo en la maduración gonadal de *C. virginica* ocasionado por la exposición a una concentración de 200 µg/L de una mezcla de hidrocarburos. Esto fue más evidente en el a los 14 días de exposición a estos compuestos en donde se observa la mayor concentración de hidrocarburos alifáticos y policíclicos aromáticos, lo que nos indicaría un efecto debido a ambos grupos de hidrocarburos.

## 8 LITERATURA CITADA

- Abdelhaleem, M., 2005. RNA helicases : Regulators of differentiation. Clin. Biochem. 38, 499–503. doi:10.1016/j.clinbiochem.2005.01.010
- Abeels, H.A., Loh, A.N., Volety, A.K., 2012. Trophic transfer and habitat use of oyster *Crassostrea virginica* reefs in southwest Florida, identified by stable isotope analysis. Mar. Ecol. Prog. Ser. 462, 125–142. doi:10.3354/meps09824
- Aguilar, C.A., Montalvo, C., Rodríguez, L., Cerón, J.G., Cerón, R.M., 2012. American oyster (*Crassostrea virginica*) and sediments as a coastal zone pollution monitor by heavy metals. Int. J. Environ. Sci. Technol. 9, 579–586. doi:10.1007/s13762-012-0078-y
- Agulleiro-Gozalbo, M.J., 2007. Fisiología de la reproducción del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*): Mecanismos endocrinos y aplicaciones en acuicultura. Universidad de Valencia.
- Aldana-Aranda, D., Enríquez-Díaz, M., Lango-Reynoso, F., Brulé, T., Montero, J., Baqueiro-Cárdenas, E., 2014. Reproductive strategies of the eastern oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) in tropical lagoons of the Mexican Gulf of Mexico. J. Shellfish Res. 33, 145–152. doi:10.2983/035.033.0114
- Alonso, A., Suarez, P., Alvarez, C., San Juan, F., Molist, P., 2001. Structural study of a possible neoplasia detected in *Mytilus galloprovincialis* collected from the Ria of Vigo (NW Spain). Dis. Aquat. Organ. 47, 73–79. doi:10.3354/dao047073
- Ascencio-Aguirre, L.A., Enríquez, M., Martínez, I., Aldana-Aranda, D., 2016. Effect of temperature and salinity on the reproductive cycle of males and females of *Crassostrea virginica* (Bivalvia: Ostreidae). Rev. Biol. Trop. J. Trop. Biol. Conserv. 64, 449–459.
- Awaji, M., Matsumoto, T., Yamano, K., Kitamura, M., Hara, A., 2011. Immunohistochemical observations of vitellin synthesis and accumulation processes



- in ovary of Ezo abalone *Haliotis discus hannai*. Fish. Sci. 77, 191–197. doi:10.1007/s12562-010-0316-5
- Bacca, H., Huvet, A., Fabioux, C., Daniel, J.Y., Delaporte, M., Pouvreau, S., Van Wormhoudt, A., Moal, J., 2005. Molecular cloning and seasonal expression of oyster glycogen phosphorylase and glycogen synthase genes. Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol. 140, 635–646. doi:10.1016/j.cbpc.2005.01.005
- Baqueriro-Cárdenas, B., Aldana-Aranda, D., 2007. Differences in the exploited oyster (*Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) populations from different coastal lagoons of the Gulf of Mexico. Transitional Waters Bull. 2, 21–35. doi:10.1285/i1825229Xv1n2p21
- Barreiro Isabel, J.A., Sánchez Córdoba, L.I., Castillo Chávez, M., Sorchini Castro, P.E., Pichardo Ramírez, A.M., Jimenez Lucas, M., Stone Alcibar, M., 2016. Guía técnica del Programa Mexicano de Sanidad de Moluscos Bivalvos.
- Bebianno, M.J., Gélet, F., Hoarau, P., Serafim, M.A., Coelho, M.R., Gnassia-Barelli, M., Roméo, M., 2004. Biomarkers in *Ruditapes decussatus*: a potential bioindicator species. Biomarkers 9, 305–330. doi:10.1080/13547500400017820
- Beck, M.W., Brumbaugh, R.D., Airoidi, L., Carranza, A., Coen, L.D., Crawford, C., Defeo, O., Edgar, G.J., Hancock, B., Kay, M.C., Lenihan, H.S., Luckenbach, M.W., Toropova, C.L., Zhang, G., Guo, X., 2011. Oyster reefs at risk and recommendations for conservation, restoration, and management. Bioscience 61, 107–116. doi:10.1525/bio.2011.61.2.5
- Bergeron, J.P., Alayse-Danet, A.M., 1981. Aspartate transcarbamilase de la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* L. (Mollusque lamellibranche): Méthode de dosage et variations de L'activité dans le manteau et la gonade. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 50, 99–117.
- Bhattacharyya, S., Tobacman, J.K., 2007. Steroid sulfatase, arylsulfatases A and B, galactose-6-sulfatase, and iduronate sulfatase in mammary cells and effects of sulfated and non-sulfated estrogens on sulfatase activity. J. Steroid Biochem. Mol.

- Biol. 103, 20–34. doi:10.1016/j.jsbmb.2006.08.002
- Bigot, L., Zatylny-Gaudin, C., Rodet, F., Bernay, B., Boudry, P., Favrel, P., 2012. Characterization of GnRH-related peptides from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Peptides* 34, 303–310. doi:10.1016/j.peptides.2012.01.017
- Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170
- Botello, A. V., Rendón von Osten, J., Gold-Bouchot, G., Agraz-Hernández, C., 2005. Golfo de México, contaminación e impacto ambiental: Diagnóstico y tendencias, 2nd ed. Universidad Autónoma de Campeche, Centro de Ecología, Pesquerías y Oceanografía del Golfo de México., Campeche, México. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Bourin, M., Gautron, J., Berges, M., Attucci, S., Le Blay, G., Labas, V., Nys, Y., Rehault-Godbert, S., 2011. Antimicrobial potential of egg yolk ovoinhibitor, a multidomain Kazal-like inhibitor of chicken egg. *J. Agric. Food Chem.* 59, 12368–12374. doi:10.1021/jf203339t
- Capelli, S.M., Busalmen, J.P., de Sánchez, S.R., 2001. Hydrocarbon bioremediation of a mineral-base contaminated waste from crude oil extraction by indigenous bacteria. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 47, 233–238.
- Carmona-Uriostegui, M.A., 2015. Análisis de la contaminación marina por la industria petrolera en la región costera de Dos Bocas, Tabasco, México. Instituto Politécnico Nacional.
- Carro, N., Cobas, J., Maneiro, J., 2006. Distribution of aliphatic compounds in bivalve mollusks from Galicia after the Prestige oil spill: Spatial and temporal trends. *Environ. Res.* 100, 339–348. doi:10.1016/j.envres.2005.09.003
- Chávez-Villalba, J., Hernández-Ibarra, A., López-Tapia, M.R., Mazón-Suástegui, J.M., 2008. Prospective culture of the Cortez oyster *Crassostrea corteziensis* from Northwestern Mexico: Growth, gametogenic activity, and condition index. *J. Shellfish Res.* 27, 711–720.

- Choi, K.-S., Lewis, D.H., Powell, E.N., Ray, S.M., 1993. Quantitative measurement of reproductive output in the American oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin), using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Aquac. Fish. Manag.* 24, 299–322. doi:10.1111/j.1365-2109.1993.tb00553.x
- Chu, F.-L.E., Volety, A.K., Hale, R.C., Huang, Y., 2002. Cellular responses and disease expression in oysters (*Crassostrea virginica*) exposed to suspended field contaminated sediments. *Mar. Environ. Res.* 53, 17–35. doi:S0141-1136(01)00104-0 [pii]
- Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca (CONAPESCA), 2014. Anuario Estadístico de Acuacultura y Pesca. Sinaloa, México.
- CONANP, 2015. Programa de Manejo Área de Protección de Flora y Fauna Laguna Madre y Delta del Río Bravo. Mexico, D. F.
- Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J.M., Terol, J., Talón, M., Robles, M., 2005. Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21, 3674–3676. doi:10.1093/bioinformatics/bti610
- Croll, R.P., Wang, C., 2007. Possible roles of sex steroids in the control of reproduction in bivalve molluscs. *Aquaculture* 272, 76–86. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.06.031
- Cummins, S.F., Degnan, B.M., 2010. Sensory sea slugs. Towards decoding the molecular toolkit required for a mollusc to smell. *Commun. Integr. Biol.* 3, 423–426. doi:10.4161/cib.3.5.12091
- Cummins, S.F., Xie, F., De Vries, M.R., Annangudi, S.P., Misra, M., Degnan, B.M., Sweedler, J. V., Nagle, G.T., Schein, C.H., 2007. *Aplysia* temptin - the 'glue' in the water-borne attractin pheromone complex. *FEBS J.* 274, 5425–5437. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.06070.x
- Da'as, S., Teh, E.M., Dobson, J.T., Nasrallah, G.K., McBride, E.R., Wang, H., Neuberg, D.S., Marshall, J.S., Lin, T., Berman, J.N., 2011. Zebrafish mast cells possess an FcεRI-like receptor and participate in innate and adaptive immune responses. *Dev.*

Comp. Immunol. 35, 125–134. doi:10.1016/j.dci.2010.09.001

Demarchi, B., Hall, S., Roncal-herrero, T., Freeman, C.L., Woolley, J., Crisp, M.K., Wilson, J., Fotakis, A., Fischer, R., Kessler, B.M., Jersie-christensen, R.R., Olsen, J. V, Haile, J., Thomas, J., Marean, C.W., Parkington, J., Presslee, S., Lee-thorp, J., Ditchfield, P., Hamilton, J.F., Ward, M.W., Wang, C.M., Shaw, M.D., Harrison, T., Domi, M., Thomas-oates, J., Harding, J.H., Cappellini, E., Penkman, K., Collins, M.J., 2016. Protein sequences bound to mineral surfaces persist into deep time. *Biochem. Genomics Evol. Biol.* 5, e17092. doi:10.7554/eLife.17092

Deng, X., Pan, L., Miao, J., Cai, Y., Hu, F., 2014. Digital gene expression analysis of reproductive toxicity of benzo[a]pyrene in male scallop *Chlamys farreri*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 110, 190–196. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.09.002

Dheilly, N.M., Jouaux, A., Boudry, P., Favrel, P., Lelong, C., 2014. Transcriptomic profiling of gametogenesis in triploid Pacific oysters *Crassostrea gigas*: Towards an understanding of partial sterility associated with triploidy. *PLoS One* 9, e112094. doi:10.1371/journal.pone.0112094

Dheilly, N.M., Lelong, C., Huvet, A., Favrel, P., 2011. Development of a Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) 31,918-feature microarray: Identification of reference genes and tissue-enriched expression patterns. *BMC Genomics* 12. doi:10.1186/1471-2164-12-468

Dheilly, N.M., Lelong, C., Huvet, A., Kellner, K., Dubos, M.-P., Riviere, G., Boudry, P., Favrel, P., 2012. Gametogenesis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: A microarrays-based analysis identifies sex and stage specific genes. *PLoS One* 7, e36353. doi:10.1371/journal.pone.0036353

Dondero, F., Banni, M., Negri, A., Boatti, L., Dagnino, A., Viarengo, A., 2011. Interactions of a pesticide/heavy metal mixture in marine bivalves: a transcriptomic assessment. *BMC Genomics* 12, 195.

Ertl, N.G., O'Connor, W.A., Brooks, P., Keats, M., Elizur, A., 2016. Combined exposure to pyrene and fluoranthene and their molecular effects on the Sydney rock oyster,

*Saccostrea glomerata*. Aquat. Toxicol. 177, 136–145.  
doi:10.1016/j.aquatox.2016.05.012

Etchian, O.A., Pellerin, J., 2003. Characterization of aspartate transcarbamylase activity from gonads of the soft shell clam, *Mya arenaria*. Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol. 134, 615–629. doi:10.1016/S1096-4959(03)00021-6

Etchian, O.A., Pellerin, J., Audet, C., Mathieu, M., 2004. Sexual maturation and related changes in aspartate transcarbamylase activity of gonad tissues in the soft shell clam (*Mya arenaria*). Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol. 139, 287–297. doi:10.1016/j.cbpc.2004.08.006

Ewels, P., Lundin, S., Max, K., 2016. Data and text mining MultiQC : summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report 32, 3047–3048. doi:10.1093/bioinformatics/btw354

Fabbri, E., Capuzzo, A., 2010. Cyclic amp signaling in bivalve molluscs: An overview. J. Exp. Zool. Part A Ecol. Genet. Physiol. 313 A, 179–200. doi:10.1002/jez.592

Fabioux, C., Pouvreau, S., Le Roux, F., Huvet, A., 2004. The oyster vasa-like gene: A specific marker of the germline in *Crassostrea gigas*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 315, 897–904. doi:10.1016/j.bbrc.2004.01.145

Fan, J., Lindemann, P., Feuilleley, M.G.J., Papadopoulos, V., 2012. Structural and functional evolution of the translocator protein (18 kDa). Curr. Mol. Med. 12, 369–386.

Fathepure, B.Z., 2014. Recent studies in microbial degradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments. Front. Microbiol. 5, 1–16. doi:10.3389/fmicb.2014.00173

Fernley, P.W., Moore, M.N., Lowe, D.M., Donkin, P., Evans, S., 2000. Impact of the Sea Empress oil spill on lysosomal stability in mussel blood cells. Mar. Environ. Res. 50, 1996–2000.

Freites, L., Montero, L., Arrieche, D., Babarro, J.M.F., Saucedo, P.E., Cordova, C.,

- García, N., 2010. Influence of environmental factors on the reproductive cycle of the Eared Ark *Anadara notabilis* ( Röding , 1798 ) in Northeastern Venezuela. J. Shellfish Res. 29, 69–75.
- Frouin, H., Pellerin, J., Fournier, M., Pelletier, E., Richard, P., Pichaud, N., Rouleau, C., Garnerot, F., 2007. Physiological effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on soft-shell clam *Mya arenaria*. Aquat. Toxicol. 82, 120–134. doi:10.1016/j.aquatox.2007.02.005
- Gagné, F., Blaise, C., Pellerin, J., André, C., 2007. Neuroendocrine disruption in *Mya arenaria* clams during gametogenesis at sites under pollution stress. Mar. Environ. Res. 64, 87–107. doi:10.1016/j.marenvres.2006.12.014
- García-Soriano, R., González-Medrano, F., Zamora-Tovar, C., Vázquez--Lule, A.D., 2009. Caracterización del sitio de manglar Laguna de Morales. Sitios Mangl. con Relev. biológica y con necesidades Rehabil. ecológica 1–17.
- Gayral, P., Weinert, L., Chiari, Y., Tsagkogeorga, G., Ballenghien, M., Galtier, N., 2011. Next-generation sequencing of transcriptomes: A guide to RNA isolation in nonmodel animals. Mol. Ecol. Resour. 11, 650–661. doi:10.1111/j.1755-0998.2011.03010.x
- Gosling, E., 2008. Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture. Wiley & Sons.
- Haas, B.J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P.D., Bowden, J., Couger, M.B., Eccles, D., Li, B., Lieber, M., MacManes, M.D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N., Westerman, R., William, T., Dewey, C.N., Henschel, R., LeDuc, R.D., Friedman, N., Regev, A., 2013. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. Nat. Protoc. 8, 1494–1512. doi:10.1038/nprot.2013.084
- Hannam, M.L., Bamber, S.D., Galloway, T.S., Moody, A.J., Jones, M.B., 2010. Functional immune response in *Pecten maximus*: Combined effects of a pathogen-associated molecular pattern and PAH exposure. Fish Shellfish Immunol. 28, 249–252. doi:10.1016/j.fsi.2009.10.018
- Hanson, R.W., Reshef, L., 1997. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (gtp)

- gene expression. *Annu. Rev. Biochem* 66, 581–611.
- Hayes, P.F., Menzel, R.W., 1981. The Reproductive Cycle of Early Settling *Crassostrea virginica* (Gmelin) in the Northern Gulf of Mexico, and Its Implications for Population Recruitment. *Biol. Bull.* 160, 80–88.
- Humanson, G.L., 1972. *Animal tissue techniques*, 3rd ed. W. H. Freeman and company, San Francisco.
- Huvet, A., Béguel, J., Cavaleiro, N.P., Thomas, Y., Quillien, V., Boudry, P., Alunno-bruscia, M., Fabioux, C., 2015. Disruption of amylase genes by RNA interference affects reproduction in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J. Exp. Biol.* 218, 1740–1747. doi:10.1242/jeb.116699
- Jenny, M.J., Ringwood, A.H., Lacy, E.R., Lewitus, A.J., Kempton, J.W., Gross, P.S., Warr, G.W., Chapman, R.W., 2002. Potential indicators of stress response identified by expressed sequence tag analysis of hemocytes and embryos from the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Mar. Biotechnol.* 4, 81–93. doi:10.1007/s10126-001-0072-8
- Jenny, M.J., Walton, W.C., Payton, S.L., Powers, J.M., Findlay, R.H., Shields, B.O., Diggins, K., Pinkerton, M., Porter, D., Crane, D.M., Tapley, J., Cunningham, C., 2016. Transcriptomic evaluation of the American oyster, *Crassostrea virginica*, deployed during the Deepwater Horizon oil spill : Evidence of an active hydrocarbon response pathway. *Mar. Environ. Res.* 120, 166–181. doi:10.1016/j.marenvres.2016.08.006
- Jeong, W.-G., Cho, S.-M., 2005. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure on the fertilization and larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Shellfish Res.* 24, 209–213. doi:http://dx.doi.org/10.2983/0730-8000(2005)24[209:TEOPAH]2.0.CO;2
- Jiang, S., Heller, B., Tagliabracci, V.S., Zhai, L., Irimia, J.M., DePaoli-Roach, A.A., Wells, C.D., Skurat, A. V., Roach, P.J., 2010. Starch Binding Domain-containing Protein 1/genethonin 1 is a novel participant in glycogen metabolism. *J. Biol. Chem.* 285, 34960–34971. doi:10.1074/jbc.M110.150839

- Jin, W., Broedl, U.C., Monajemi, H., Glick, J.M., Rader, D.J., 2002. Lipase H, a new member of the triglyceride lipase family synthesized by the intestine. *Genomics* 80, 268–273. doi:10.1006/geno.2002.6837
- Joye, S.B., Bracco, A., Özgökmen, T.M., Chanton, J.P., Grosell, M., Macdonald, I.R., Cordes, E.E., Montoya, J.P., Passow, U., 2016. The Gulf of Mexico ecosystem, six years after the Macondo oil well blowout. *Deep. Res. Part II* 129, 4–19. doi:10.1016/j.dsr2.2016.04.018
- Kajiwara, M., Kuraku, S., Kurokawa, T., Kato, K., Toda, S., Hirose, H., Takahashi, S., Shibata, Y., Iguchi, T., Matsumoto, T., Miyata, T., Miura, T., Takahashi, Y., 2006. Tissue preferential expression of estrogen receptor gene in the marine snail, *Thais clavigera*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 148, 315–326. doi:10.1016/j.ygcen.2006.03.016
- Kanally, R. a, Harayama, S., 2000. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J. Bacteriol.* 182, 2059–2067. doi:10.1128/JB.182.8.2059-2067.2000.Updated
- Kim, S.K., Kim, B.K., Kim, H.J., Yoo, M.S., Mykles, D.L., Kim, H., 2008. Pancreatic lipase-related protein (PY – PLRP) highly expressed in the vitellogenic ovary of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Comp. Biochem. Physiol.* , Part B 151, 52–58. doi:10.1016/j.cbpb.2008.05.009
- Krishnakumar, P.K., Casillas, E., Varanasi, U., 1995. Effect of environmental contaminants on the health of *Mytilus edulis* from puget sound, Washington: Cytochemical measures of lysosomal responses and detoxifying enzymes using automatic image analysis. *Mar. Environ. Res.* 39, 249–261. doi:10.1016/0141-1136(95)98413-7
- Lang, R.P., Bayne, C.J., Camara, M.D., Cunningham, C., Jenny, M.J., Langdon, C.J., 2009. Transcriptome profiling of selectively bred Pacific oyster *Crassostrea gigas* families that differ in tolerance of heat shock. *Mar. Biotechnol.* 11, 650–668. doi:10.1007/s10126-009-9181-6
- Langmead, B., Salzberg, S.L., 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat.*



Methods 9, 357–359. doi:10.1038/nmeth.1923

- Li, W.-W., Jin, X.-K., He, L., Gong, Y.-N., Jiang, H., Wang, Q., 2011. Molecular cloning and tissue expression of the fatty acid-binding protein (Es-FABP9) gene in the reproduction seasons of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Mol Biol Rep* 38, 5169–5177. doi:10.1007/s11033-010-0666-1
- Mathieu, M., 1987. Utilization of aspartate transcarbamylase activity in the study of neuroendocrinal control of gametogenesis in *Mytilus edulis*. *J. Exp. Zool.* 241, 247–252.
- Matsumoto, T., Nakamura, A.M., Mori, K., Akiyama, I., Hirose, H., Takahashi, Y., 2007. Oyster estrogen receptor: cDNA cloning and immunolocalization. *Gen. Comp. Endocrinol.* 151, 195–201. doi:10.1016/j.ygcen.2007.01.016
- Matsumoto, T., Nakamura, A.M., Mori, K., Kayano, T., 2003. Molecular characterization of a cDNA encoding putative vitellogenin from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Zoolog. Sci.* 20, 37–42. doi:10.2108/zsj.20.37
- Matus De la Parra, A., García, O., San Juan, F., 2005. Seasonal variations on the biochemical composition and lipid classes of the gonadal and storage tissues of *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1794) in relation to the gametogenic cycle. *J. Shellfish Res.* 24, 457–467. doi:10.2983/0730-8000(2005)24[457:SVOTBC]2.0.CO;2
- Men, B., He, M., Tan, L., Lin, C., Quan, X., 2009. Distributions of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Daliao River Estuary of Liaodong Bay, Bohai Sea (China). *Mar. Pollut. Bull.* 58, 818–826. doi:10.1016/j.marpolbul.2009.01.022
- Mi, H., Huang, X., Muruganujan, A., Tang, H., Mills, C., Kang, D., Thomas, P.D., 2017. PANTHER version 11: Expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. *Nucleic Acids Res.* 45, D183–D189. doi:10.1093/nar/gkw1138
- Minakata, H., Shigeno, S., Kano, N., Haraguchi, S., Osugi, T., Tsutsui, K., 2009. Octopus gonadotrophin-releasing hormone: A multifunctional peptide in the endocrine and nervous systems of the cephalopod. *J. Neuroendocrinol.* 21, 322–326.

doi:10.1111/j.1365-2826.2009.01852.x

Mueller, O., Lightfoot, S., Schroeder, A., 2016. RNA integrity number (RIN)-Standardization of RNA quality control, Agilent Technologies. doi:10.1101/gr.189621.115.7

Nestlerode, J.A., Luckenbach, M.W., O'Beirn, F.X., 2007. Settlement and survival of the oyster *Crassostrea virginica* on created oyster reef habitats in Chesapeake Bay. Restor. Ecol. 15, 273–283. doi:10.1111/j.1526-100X.2007.00210.x

Noboru-Nishigima, F., Weber, R.R., Caruso-Bícego, M., 2001. Aliphatic and Aromatic Hydrocarbons in Sediments of Santos and Cananea, SP, Brazil. Mar. Pollut. Bull. 42, 1064–1072.

Noriega-Espíndola, K.G., 2009. Descripción y funcionamiento del sistema flotante de producción, almacenamiento y descarga “FPSO” para el manejo de hidrocarburos de aguas profundas. Universidad Nacional Autónoma de México.

Pan, L., Miao, J., Wang, J., Liu, J., 2008. AHH activity, tissue dose and DNA damage in different tissues of the scallop *Chlamys farreri* exposed to benzo [ a ] pyrene. Environ. Pollut. 153, 192–198. doi:10.1016/j.envpol.2007.07.022

Paranko, J., Pelliniemi, L.J., 1992. Differentiation of smooth muscle cells in the fetal rat testis and ovary: localization of alkaline phosphatase, smooth muscle myosin, F-actin, and desmin. Cell & Tissue Res. 268, 521–530.

PEMEX, 2010. Las reservas de hidrocarburos de México, 2010.

Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 29, 16–21.

Richards, J.S., Russell, D.L., Ochsner, S., Hsieh, M., Doyle, K.H., Falender, A.E., Lo, Y.K., Sharma, S.C., 2002. Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization, in: Signaling Pathways in the Ovary. pp. 195–220.

Robinson, M.D., McCarthy, D.J., Smyth, G.K., 2010. edgeR: A Bioconductor package for

- differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139–140. doi:10.1093/bioinformatics/btp616
- Rodet, F., Lelong, C., Dubos, M., Costil, K., Favrel, P., 2005. Molecular cloning of a molluscan gonadotropin-releasing hormone receptor orthologue specifically expressed in the gonad. *Biochim. Biophys. Acta* 1730, 187–195. doi:10.1016/j.bbaexp.2005.05.012
- Sarinsky, G., Carroll, M.A., Nduka, E., Catapane, E.J., 2005. Growth and survival of the American oyster *Crassostrea virginica* in Jamaica Bay, New York. *vivo* 27, 15–26. doi:10.1016/bs.mcb.2015.01.016.Observing
- Smith-Unna, R., Bournsnel, C., Patro, R., Hibberd, J.M., Kelly, S., 2016. TransRate : reference-free quality assessment of de novo transcriptome assemblies 1134–1144. doi:10.1101/gr.196469.115.Freely
- Song, Q., Zheng, P., Qiu, L., Jiang, X., Zhao, H., Zhou, H., Han, Q., Diao, X., 2016. Toxic effects of male *Perna viridis* gonad exposed to BaP , DDT and their mixture : A metabolomic and proteomic study of the underlying mechanism. *Toxicol. Lett.* 240, 185–195. doi:10.1016/j.toxlet.2015.10.031
- Song, Y., Miao, J., Cai, Y., Pan, L., 2015. Molecular cloning, characterization, and expression analysis of a gonadotropin-releasing hormone-like cDNA in the clam, *Ruditapes philippinarum*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 189, 47–54. doi:10.1016/j.cbpb.2015.07.005
- Stegeman, J.J., Teal, J.M., 1973. Accumulation, release and retention of petroleum hydrocarbons by the oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol.* 22, 37–44. doi:10.1007/BF00388908
- Tay, K.L., Teh, S.J., Doe, K., Lee, K., Jackman, P., 2003. Histopathologic and histochemical biomarker responses of Baltic clam, *Macoma balthica*, to contaminated Sydney Harbour sediment, Nova Scotia, Canada. *Environ. Health Perspect.* 111, 273–280. doi:10.1289/ehp.5437
- Tian, S., Pan, L., Sun, X., 2013. An investigation of endocrine disrupting effects and toxic

- mechanisms modulated by benzo [ a ] pyrene in female scallop *Chlamys farreri*. *Aquat. Toxicol.* 144–145, 162–171. doi:10.1016/j.aquatox.2013.09.031
- Tolosa, I., de Mora, S.J., Fowler, S.W., Villeneuve, J., Bartocci, J., Cattini, C., 2005. Aliphatic and aromatic hydrocarbons in marine biota and coastal sediments from the Gulf and the Gulf of Oman. *Mar. Pollut. Bull.* 50, 1619–1633. doi:10.1016/j.marpolbul.2005.06.029
- Tuvikene, A., 2016. Finnish Zoological and Botanical Publishing Board Responses of fish to polycyclic aromatic hydrocarbons ( PAHs ) 32, 295–309.
- Vidal, M.L., Narbonne, J.F., 2000. Characterization of Glutathione S-Transferase activity in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 64, 455–462. doi:10.1007/s001280000022
- Wentzel, A., Ellingsen, T.E., Kotlar, H., Zotchev, S.B., Throne-Holst, M., 2007. Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes. *Appl Microbiol Biotechnol* 76, 1209–1221. doi:10.1007/s00253-007-1119-1
- Werner, I., Teh, S.J., Datta, S., Lu, X., Young, T.M., 2004. Biomarker responses in *Macoma nasuta* (Bivalvia) exposed to sediments from northern San Francisco Bay. *Mar. Environ. Res.* 58, 299–304. doi:10.1016/j.marenvres.2004.03.075
- Xue, Q., Schey, K.L., Volety, A.K., Chu, F.E., La, J.F., 2004. Purification and characterization of lysozyme from plasma of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) 139, 11–25. doi:10.1016/j.cbpc.2004.05.011
- Yang, D., Yin, C., Chang, Y., Dou, Y., Hao, Z., Ding, J., 2016. Transcriptome analysis of male and female mature gonads of Japanese scallop *Patinopecten yessoensis*. *Genes Genomics* 38, 1041–1052. doi:10.1007/s13258-016-0449-8
- Yevich, P.P., Barszcz, C.A., 1975. Neoplasia in soft-shell clams (*Mya arenaria*) collected from oil-impacted sites. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 409–425.
- Yu, J., Zhang, L., Li, Y., Li, R., Zhang, M., Li, W., Xie, X., Wang, S., Hu, X., Bao, Z., 2017. Genome-wide identification and expression profiling of the SOX gene family in a

bivalve mollusc *Patinopecten yessoensis*. *Gene* 627, 530–537.  
doi:10.1016/j.gene.2017.07.013

Zhang, H., Pan, L., Zhang, L., 2012. Molecular cloning and characterization of estrogen receptor gene in the Scallop *Chlamys farreri*: Expression profiles in response to endocrine disrupting chemicals. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 156, 51–57.  
doi:10.1016/j.cbpc.2012.03.007

Zhao, S., Guo, Y., Sheng, Q., Shyr, Y., 2014. Heatmap3: an improved heatmap package with more powerful and convenient features. *BMC Bioinformatics* 15, P16.  
doi:10.1186/1471-2105-15-S10-P16

## ANEXO 1. Genes con expresión diferencial no relacionados con la maduración gonadal.

Tabla 12. Genes del sistema inmune con expresión diferencial respecto al control en la gónada de *C. virginica* expuesto a 200 µg/L de hidrocarburos en T1 (7días), T2 (14 días) y T3 (21 días).

Sistema inmune				
Gen	Proteína	T1	T2	T3
DEF1	Defensin-1	Up	Up	
BDEF	Big defensin	Down		
CHIT1	Chitotriosidase-1	Down		
TAL1	T-cell acute lymphocytic leukemia 1	Down	Down	
TAXB1	Tax1-binding 1 homolog (negative regulation of apoptotic process)	Down	Down	
PE1	Peritrophin-1	Down		Down
DEFI	Defensin		Up	
MRC1	Macrophage mannose receptor 1		Down	
LYS2	Lysozyme 2		Down	
LYS3	Lysozyme 3		Down	
FCGBP	IgGFc-binding		Down	
CLC4E	C-type lectin domain family 4-member E		Down	
DMBT1	Deleted in malignant brain tumors 1		Down	
BGBP	Beta-1,3-glucan-binding		Down	
C1QT3	Complement C1q tumor necrosis factor-related 3		Down	
SPI1	Serine protease inhibitor Cvsi-1		Down	
SPI2	Serine protease inhibitor Cvsi-2		Down	
DPGN	Serine protease inhibitor dipetalogastin (Fragment)		Down	
CYT6	Cysteinease inhibitor 6		Down	
MCPI	PFour-domain proteases inhibitor		Down	
C1QL4	Complement C1q 4		Down	
SCP	Sarcoplasmic calcium-binding (Shellfish allergen)		Down	
TYRO2	Tyrosinase 2		Down	
LECG	Galactose-specific lectin nattectin		Down	
SAA5	Serum amyloid A-5		Down	
COL12	Collectin-12		Down	
PLMN	Plasminogen (Fragment)		Down	
MEP1B	Meprin A subunit beta		Down	
LAC1	Laccase ( <i>C. gigas</i> SI and detoxification processes)		Down	
PDC6I	Programmed cell death 6-interacting (Apoptosis)		Down	
HIP	Heavy metal-binding HIP (Heavy metal accumulation and/or tolerance)		Down	
TIMP3	Metalloproteinase inhibitor 3		Down	Down
MRC2	C-type mannose receptor 2		Down	Down
PGSC2	Peptidoglycan-recognition SC2		Down	Down
CYT8	Cysteinease inhibitor 8		Down	Down

<b>LYS1</b>	Lysozyme 1	Down	Up	Down
<b>TRYG1</b>	Tryptase gamma			Up
<b>CTRL</b>	Chymotrypsin-like serine proteinase			Up
<b>YES</b>	Tyrosine- kinase Yes (SI y dif. Celular)			Down
<b>ST1C4</b>	Sulfotransferase 1C4 (Response to xenobiotic compounds)			Down
<b>TICN3</b>	Testican-3	Down	Down	Down
<b>CHI1</b>	Chitinase 1	Down	Down	Down

Tabla 13. Genes de estrés oxidativo con expresión diferencial respecto al control en la gónada de *C. virginica* expuesto a 200 µg/L de hidrocarburos en T1 (7días), T2 (14 días) y T3 (21 días).

Estrés oxidativo				
Gen	Proteína	T1	T2	T3
<b>P5CR2</b>	Pyrroline-5-carboxylate reductase 2	Down		
<b>DOXA1</b>	Dual oxidase maturation factor 1	Down		
<b>AL3B1</b>	Aldehyde dehydrogenase family 3-member B1	Down		
<b>GSTO1</b>	Glutathione S-transferase omega-1	Down	Down	
<b>CATA</b>	Catalase	Down	Down	
<b>ALDH</b>	Aldehyde dehydrogenase		Down	
<b>EASE</b>	FAD-linked oxidoreductase easeE		Down	
<b>CATL1</b>	Cathepsin L1		Down	
<b>CATK</b>	Cathepsin K		Down	
<b>CATL</b>	Cathepsin L		Down	Down
<b>A2478</b>	Uncharacterized FAD-linked oxidoreductase ARB_02478		Down	Down
<b>GSTA3</b>	Glutathione S-transferase 3			Down

Tabla 14. Genes de proteínas chaperonas con expresión diferencial respecto al control en la gónada de *C. virginica* expuesto a 200 µg/L de hidrocarburos en T1 (7días), T2 (14 días) y T3 (21 días).

Proteínas chaperonas				
Gen	Proteína	T1	T2	T3
<b>CDC37</b>	Hsp90 co-chaperone Cdc37	Down		
<b>FKBP2</b>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP2		Down	
<b>PPIC</b>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C		Down	
<b>CRYAB</b>	Alpha-crystallin B chain			Up

Tabla 15. Genes de proteínas ribosomales con expresión diferencial respecto al control en la gónada de *C. virginica* expuesto a 200 µg/L de hidrocarburos en T1 (7días), T2 (14 días) y T3 (21 días).

Proteínas ribosomales				
Gen	Proteína	T1	T2	T3
RL12	60S ribosomal L12	Down	Down	
RL18	60S ribosomal L18	Down	Down	
RL13A	60S ribosomal L13a		Down	Down
RS6	40S ribosomal S6			Up
RL30	60S ribosomal L30			Up
RL4	60S ribosomal L4			Up
RL35	60S ribosomal L35			Up
RL39	60S ribosomal L39			Up
RL7A	60S ribosomal L7a			Up
RSSA	40S ribosomal			Up
RL36	60S ribosomal L36			Down

Tabla 16. Genes de metabolismo de ácidos nucleicos con expresión diferencial respecto al control en la gónada de *C. virginica* expuesto a 200 µg/L de hidrocarburos en T1 (7días), T2 (14 días) y T3 (21 días).

Metabolismo de ácidos nucleicos				
Gen	Proteína	T1	T2	T3
P3A2	DNA-binding P3A2	Down		
SF3A1	Splicing factor 3A subunit 1	Down		
RPB2	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB2	Down	Down	
WDR46	WD repeat-containing 46		Down	
GBLP	Guanine nucleotide-binding subunit beta-2-like 1		Down	
RNOY	Ribonuclease		Down	
MD12L	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 12		Down	
PRP39	Pre-mRNA-processing factor 39		Down	
ROA2	Heterogeneous nuclear ribonucleos A2		Down	
TBX1A	T-box transcription factor TBX1-A		Down	
ALX1	ALX homeobox 1		Down	
IRF2	Interferon regulatory factor 2		Down	Down
U520	U5 small nuclear ribonucleo 200 kDa helicase		Down	Down
PARP1	Poly [ADP-ribose] polymerase 1	Down	Down	Down
RBM39	RNA-binding 39	Down	Down	Down
LITAF	Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha factor homolog	Down		Down
NH2L1	NHP2-like protein 1			Up
XDH	Xanthine dehydrogenase			Up



<b>EF1A</b>	Elongation factor 1-alpha (Fragment)		Down
<b>SMC1A</b>	Structural maintenance of chromosomes 1A	Down	Down

Tabla 17. Genes de metabolismo de aminoácidos con expresión diferencial respecto al control en la gónada de *C. virginica* expuesto a 200 µg/L de hidrocarburos en T1 (7días), T2 (14 días) y T3 (21 días).

<b>Metabolismo de aminoácidos</b>				
<b>Gen</b>	<b>Proteína</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>
<b>CBPB</b>	Carboxypeptidase B		Down	
<b>CBPB1</b>	Carboxypeptidase B		Down	
<b>ENTK</b>	Enteropeptidase		Down	
<b>GLYC</b>	Serine hydroxymethyltransferase cytosolic		Down	
<b>SERA</b>	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase		Down	
<b>CNPD1</b>	CNPPD1 (Cyclin Pas1/PHO80 Domain Containing Protein 1)		Down	Down
<b>CDO1</b>	Cysteine dioxygenase type 1			Up
<b>GCSP</b>	Glycine dehydrogenase (decarboxylating) mitochondrial			Up
<b>GCDH</b>	Glutaryl- mitochondrial			Up
<b>BHMT2</b>	S-methylmethionine—homocysteine methyltransferase BHMT2	S-		Down
<b>L14AA</b>	LSM14 homolog A-A			Down

Tabla 18. Genes de metabolismo de proteínas con expresión diferencial respecto al control en la gónada de *C. virginica* expuesto a 200 µg/L de hidrocarburos en T1 (7días), T2 (14 días) y T3 (21 días).

<b>Metabolismo de proteínas</b>				
<b>Gen</b>	<b>Proteína</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>
<b>PPIB</b>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	Down		
<b>PIMT</b>	L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase	Down		
<b>C1QL2</b>	Complement C1q 2		Down	
<b>DLGP1</b>	Disks large-associated 1		Down	
<b>ADRM1</b>	Proteasomal ubiquitin receptor ADRM1			Down
<b>TRIM2</b>	Tripartite motif-containing 2 (Ubiquitinacion de proteinas)			Down

**Tabla 19. Genes de metabolismo de vitaminas con expresión diferencial respecto al control en la gónada de *C. virginica* expuesto a 200 µg/L de hidrocarburos en T1 (7días), T2 (14 días) y T3 (21 días).**

<b>Metabolismo de vitaminas</b>				
<b>Gen</b>	<b>Proteína</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>
YAJ0	Uncharacterized oxidoreductase		Down	Down
MMAC	Methylmalonic aciduria and homocystinuria type C homolog			Up
LGMN	Legumain			Up

**Tabla 20. Genes de metabolismo de lípidos con expresión diferencial respecto al control en la gónada de *C. virginica* expuesto a 200 µg/L de hidrocarburos en T1 (7días), T2 (14 días) y T3 (21 días).**

<b>Metabolismo de lípidos</b>				
<b>Gen</b>	<b>Proteína</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>
PLB1	Phospholipase membrane-associated		Down	
LIPP	Pancreatic triacylglycerol lipase		Down	
CRYL1	Lambda-crystallin homolog		Down	
THIKA	3-ketoacyl- thiolase peroxisomal		Down	
AT2L1	Ethanolamine-phosphate phospho-lyase		Down	
ACOX1	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase		Down	
ACAC	Acetyl- carboxylase		Down	Down
CEL3B	Chymotrypsin-like elastase family member 3B			Up

**Tabla 21. Genes de metabolismo de carbohidratos con expresión diferencial respecto al control en la gónada de *C. virginica* expuesto a 200 µg/L de hidrocarburos en T1 (7días), T2 (14 días) y T3 (21 días).**

<b>Metabolismo de carbohidratos</b>				
<b>Gen</b>	<b>Proteína</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>
GUN	Endoglucanase		Down	
GUN4	Endoglucanase E-4		Down	
GUNF	Endoglucanase F		Down	
LPH	Lactase-phlorizin hydrolase		Down	
MDHC	Malate cytoplasmic		Down	Down

**Tabla 22. Genes de componente celular con expresión diferencial respecto al control en la gónada de *C. virginica* expuesto a 200 µg/L de hidrocarburos en T1 (7días), T2 (14 días) y T3 (21 días).**

Componente celular				
Gen	Proteína	T1	T2	T3
PLST	Plastin-3	Down		
KLHL5	Kelch 5	Down		
MYOF	Myoferlin	Down		
CNN3	Calponin-3	Down		
PDLI3	PDZ and LIM domain 3	Down		
TES	Testin	Down		
PRRT1	Proline-rich transmembrane 1		Up	
ACT	Actin		Down	
TBA1	Tubulin alpha-1 chain (Fragment)		Down	
ITM2A	Integral membrane 2 <sup>a</sup>		Down	
MATN1	Cartilage matrix		Down	
KCP	Kielin chordin		Down	
LECH	Hepatic lectin		Down	
L2GL1	Lethal (2) giant larvae homolog 1		Down	
MARE1	Microtubule-associated RP EB family member 1	Down	Down	Down

**Tabla 23. Genes de adhesión celular con expresión diferencial respecto al control en la gónada de *C. virginica* expuesto a 200 µg/L de hidrocarburos en T1 (7días), T2 (14 días) y T3 (21 días).**

Adhesión celular				
Gen	Proteína	T1	T2	T3
FNTA	Farnesyltransferase geranylgeranyltransferase type-1 subunit alpha	Down		Down
Y381	ankyrin repeat protein RF_0381	Down		
CADM2	Cell adhesion molecule 2		Down	
EPDR1	Ependymin-related 1		Down	
NINJ1	Ninjurin-1		Down	
POSTN	Periostin		Down	
PGCB	Brevican core		Down	
PGCA	Aggrecan core		Down	
NCAN	Neurocan core		Down	Up
CO6A6	Collagen alpha-6(VI) chain		Down	Down
AGRN	Agrin		Down	Down

**Tabla 24. Genes de diferenciación celular con expresión diferencial respecto al control en la gónada de *C. virginica* expuesto a 200 µg/L de hidrocarburos en T1 (7días), T2 (14 días) y T3 (21 días).**

Diferenciación celular				
Gen	Proteína	T1	T2	T3
PTBP3	Polypyrimidine tract-binding 3		Down	
PTN11	Tyrosine- phosphatase non-receptor type 11		Down	

**Tabla 25. Genes de transporte celular con expresión diferencial respecto al control en la gónada de *C. virginica* expuesto a 200 µg/L de hidrocarburos en T1 (7días), T2 (14 días) y T3 (21 días).**

Transporte celular				
Gen	Proteína	T1	T2	T3
NU205	Nuclear pore complex Nup205	Down		
ATP7A	Copper-transporting ATPase 1	Down		
VPP1	V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 1	Down		
SC6A9	Sodium- and chloride-dependent glycine transporter 1	Down		
PRSS8	Prostasin		Down	
SC24C	transport Sec24C		Down	
SORL	Sortilin-related receptor			Down

**Tabla 26. Genes de la cadena respiratoria con expresión diferencial respecto al control en la gónada de *C. virginica* expuesto a 200 µg/L de hidrocarburos en T1 (7días), T2 (14 días) y T3 (21 días).**

Cadena respiratoria				
Gen	Proteína	T1	T2	T3
NDUS4	NADH dehydrogenase	Down		Up
IDHP	Isocitrate dehydrogenase	Down		Down
C560	Succinate dehydrogenase cytochrome b560 mitochondrial		Down	
CISY	Citrate mitochondrial (Fragment)		Down	
MPPB	Mitochondrial-processing peptidase subunit beta		Down	
PISD	Phosphatidylserine decarboxylase mitochondrial		Down	Down
SQRD	Sulfide:quinone mitochondrial			Down

**Tabla 27. Otros genes con expresión diferencial con respecto al control en la gónada de *C. virginica* expuesto a 200 µg/L de hidrocarburos en T1 (7días), T2 (14 días) y T3 (21 días).**

<b>Otros</b>				
<b>Gen</b>	<b>Proteína</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>
PLC	Perlucin (Shell and pearl formation)		Down	
PLCL	Perlucin (Shell and pearl formation)		Down	
MDMC	O-methyltransferase (Antibiotic biosynthesis)		Down	Down
FIBC	Fibrinolytic isozyme C (Blood coagulation)			Up

## ANEXO 2. Protocolo para síntesis de DNA complementario (cDNA) Kit ImProm-II Reverse Transcription System

### a) Combinación de primer con RNA blanco y desnaturalización

1. Descongelar el RNA en hielo, así como el resto de los reactivos a utilizar.
2. Combinar el RNA (1.0 µg) con el oligo dt y agua libre de nucleasas. Volumen final de 5 µL.

Reactivos	1 rx
RNA (hasta 1 µg/rx)	X µL
Oligo dt15 primer (0.5 µg/rx)	1.0 µL
Agua libre de nucleasas	X µL
Volumen final	5.0 µL

3. Incubar a 70 °C por 5 minutos. Colocar en hielo inmediatamente y centrifugar para colectar el condensado.

### b) Transcriptasa reversa

4. Preparar el Mix ImProm II, vortexear y mantener en hielo hasta utilizar.

Reacción experimental	1 rx
Agua libre de nucleasas	5.3 µL
ImProm II 5x Rx Buffer	4.0 µL
MgCl <sub>2</sub>	3.2 µL
RNA sin recombinante	0.5 µL
ImProm II Transcriptasa reversa	1.0 µL
dNTP's mix	1.0 µL
Volumen final	15 µL

- Adicionar 15  $\mu\text{L}$  del mix preparado a cada tubo de reacción correspondiente e incubado con anterioridad a 70  $^{\circ}\text{C}$ , para obtener un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ .
- Incubar la reacción con el siguiente programa:

<b>Proceso</b>	<b>Temperatura (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</b>	<b>Tiempo</b>
Alineamiento	25	5 min
Extensión	42	60 min
Inactivación de la transcriptasa reversa	70	

- Verificar mediante PCR punto final y almacenar a -20 o -80  $^{\circ}\text{C}$ .

### ANEXO 3. Curvas de eficiencia de los genes de referencia.

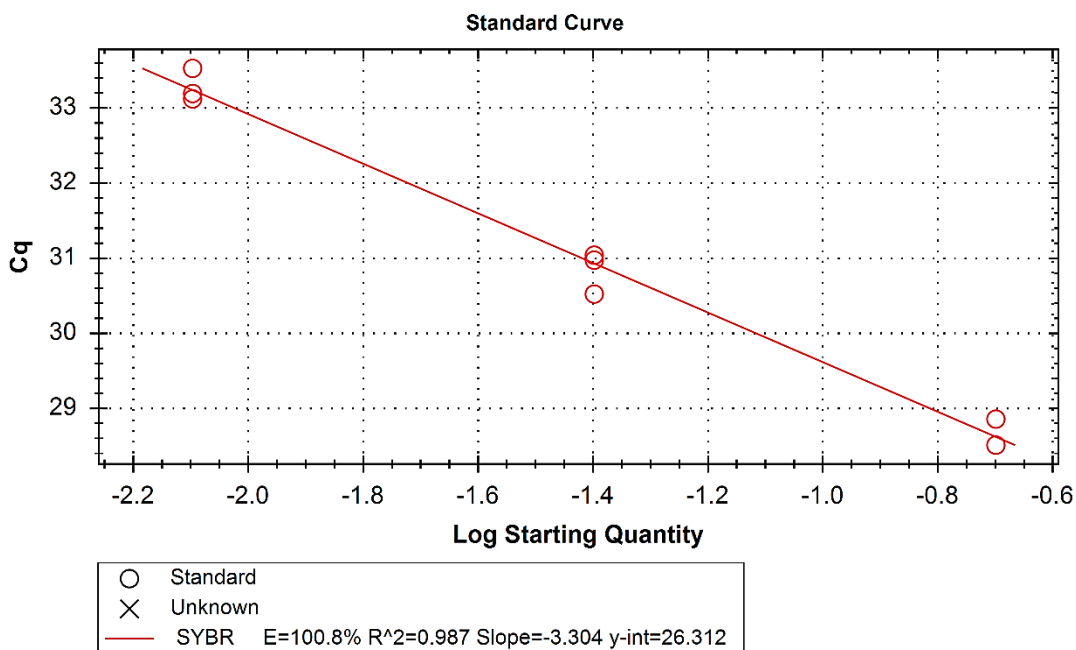


Figura 30. Curva de eficiencia del gen KS6A1

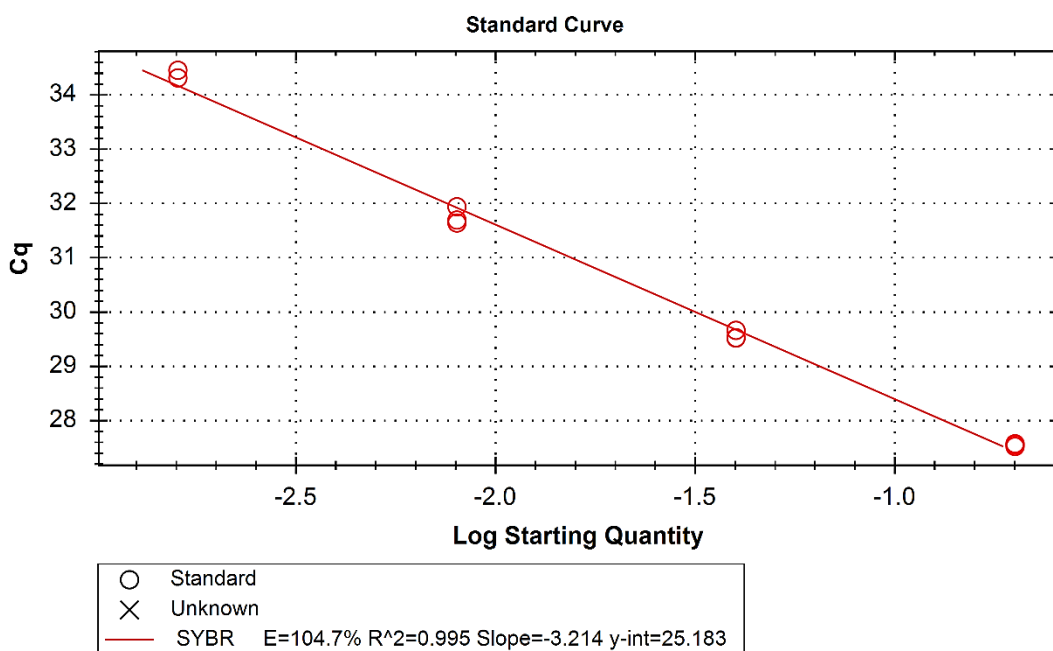
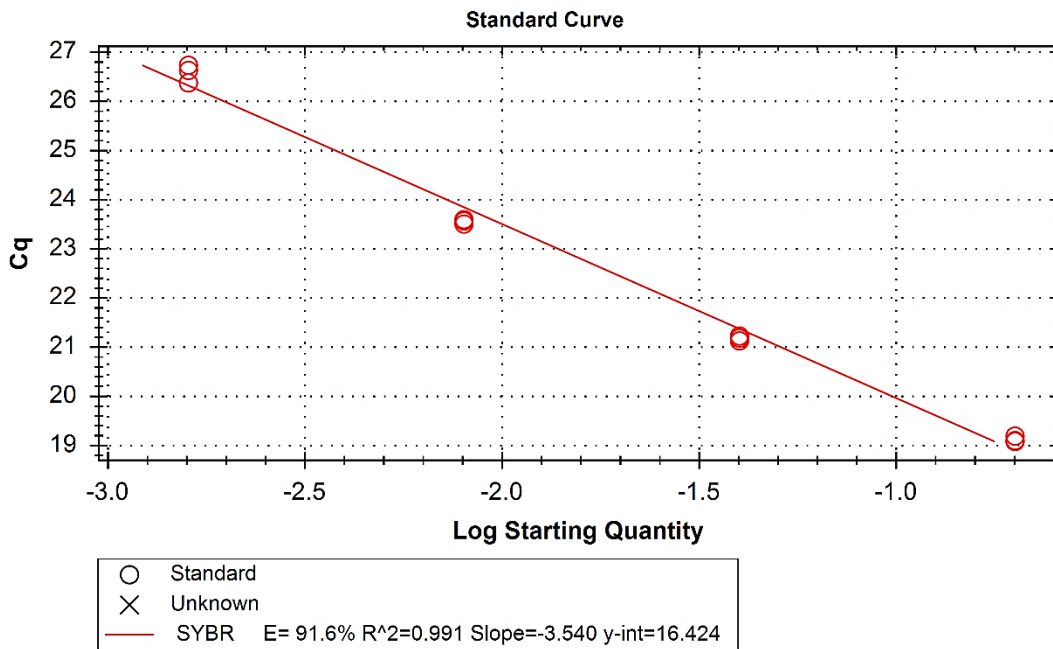
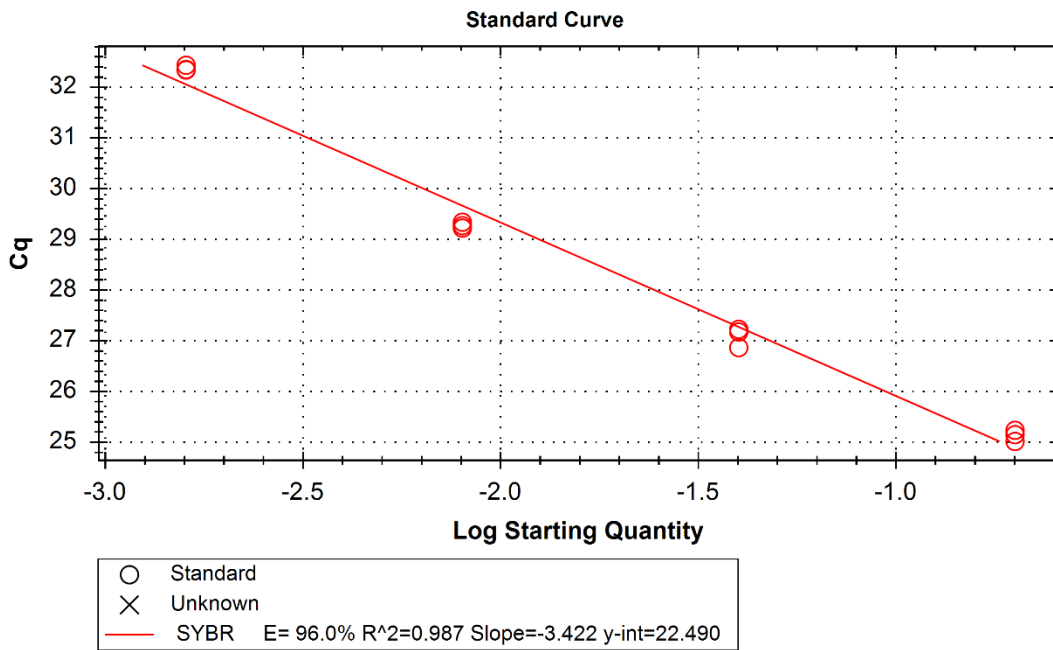


Figura 31. Curva de eficiencia del gen NATD1.

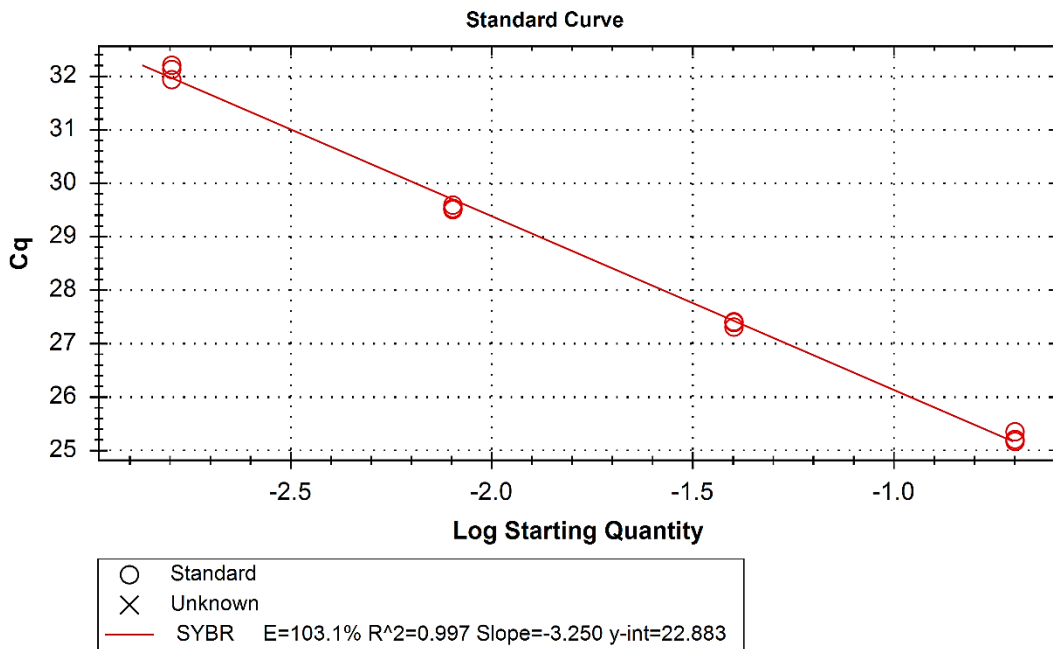




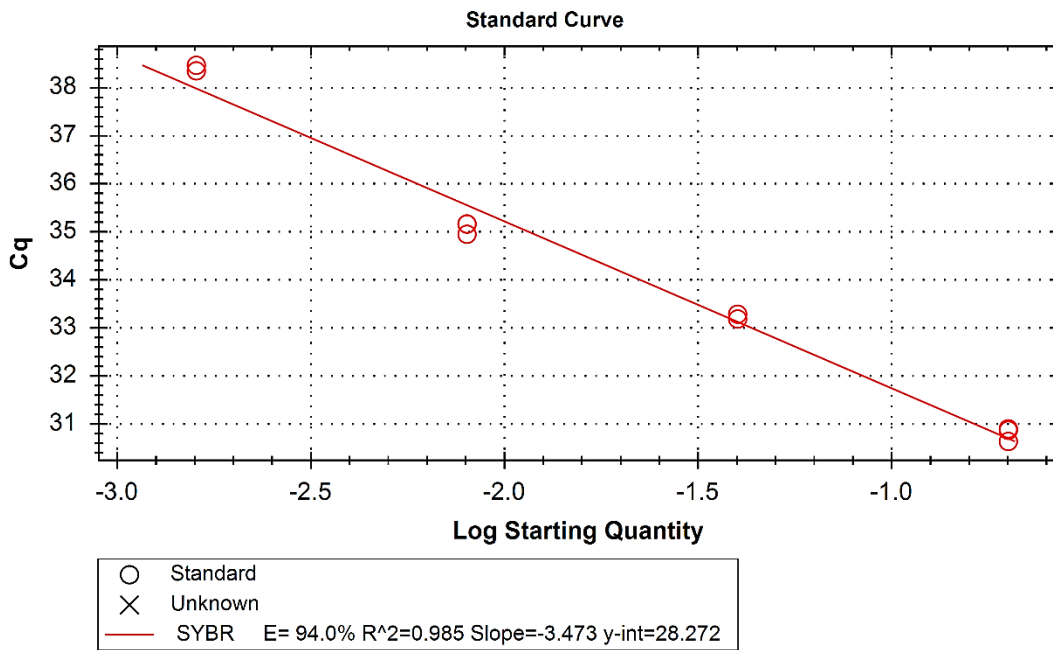
**Figura 32. Curva de eficiencia del gen RPL19**



**Figura 33. Curva de eficiencia del gen RPS24.**



**Figura 34. Curva de eficiencia del gen TSPO.**



**Figura 35. Curva de eficiencia del gen UBP37.**

## ANEXO 4. Curvas de eficiencia de los genes de interés

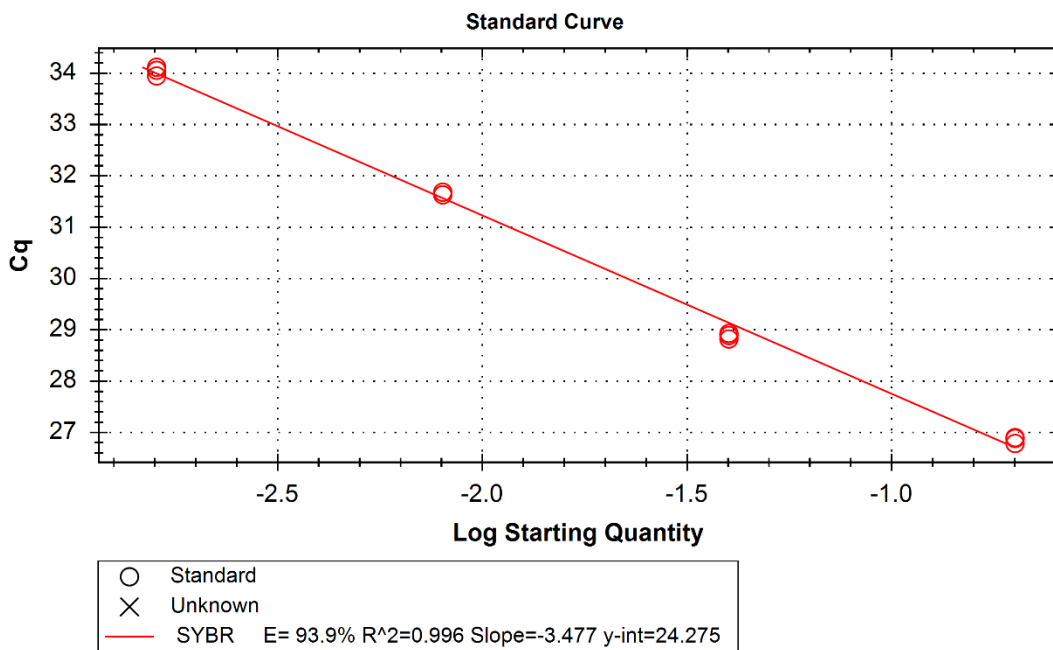


Figura 36. Curva de eficiencia del gen ARSB.

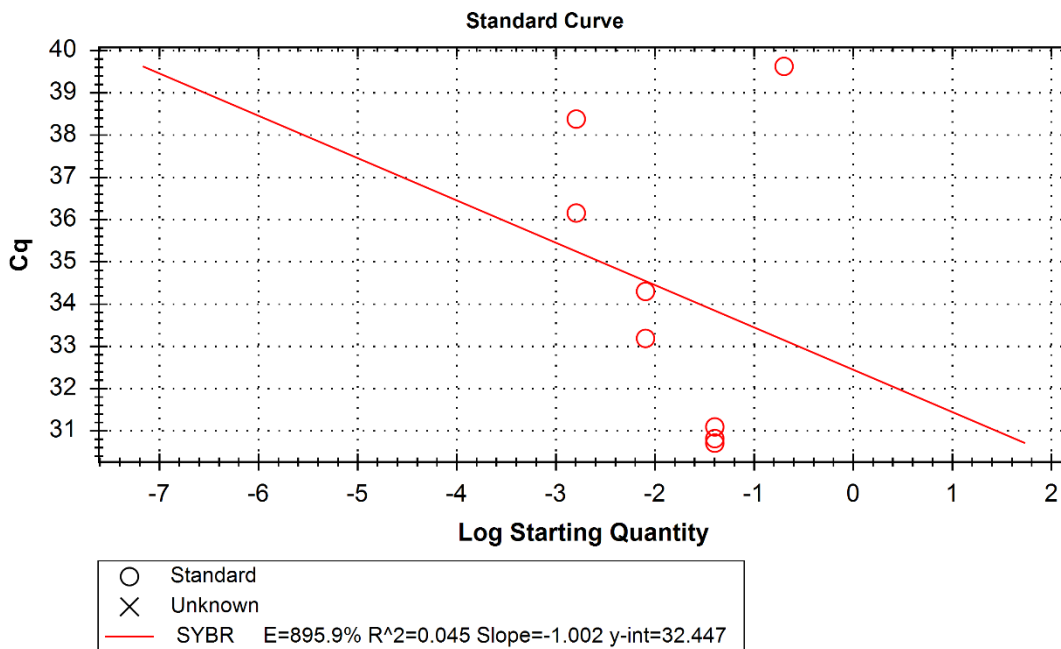
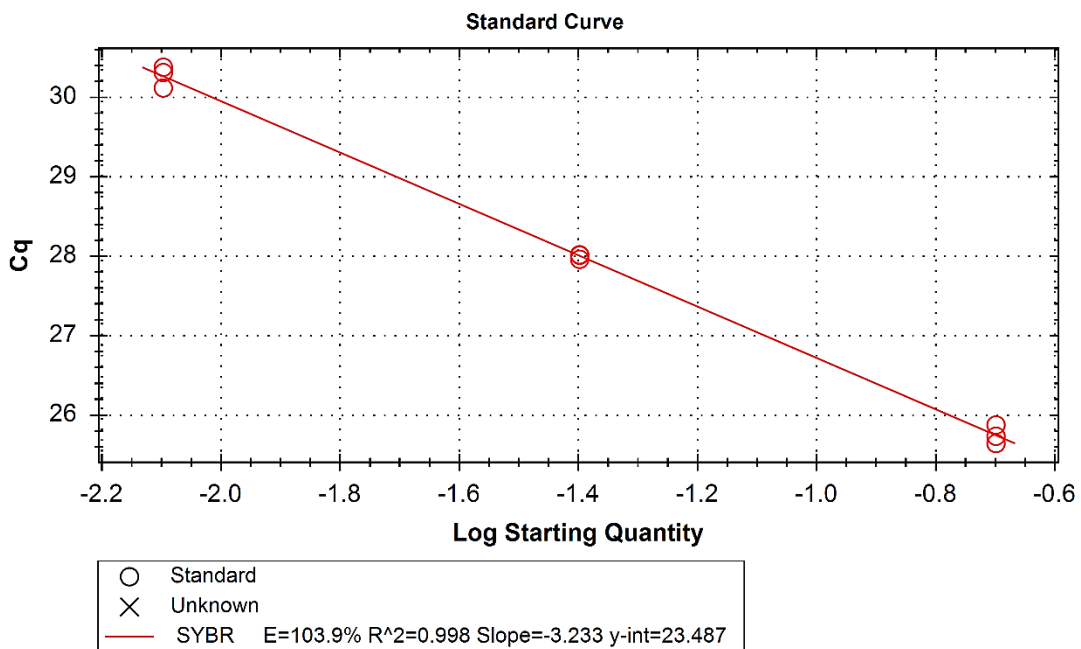
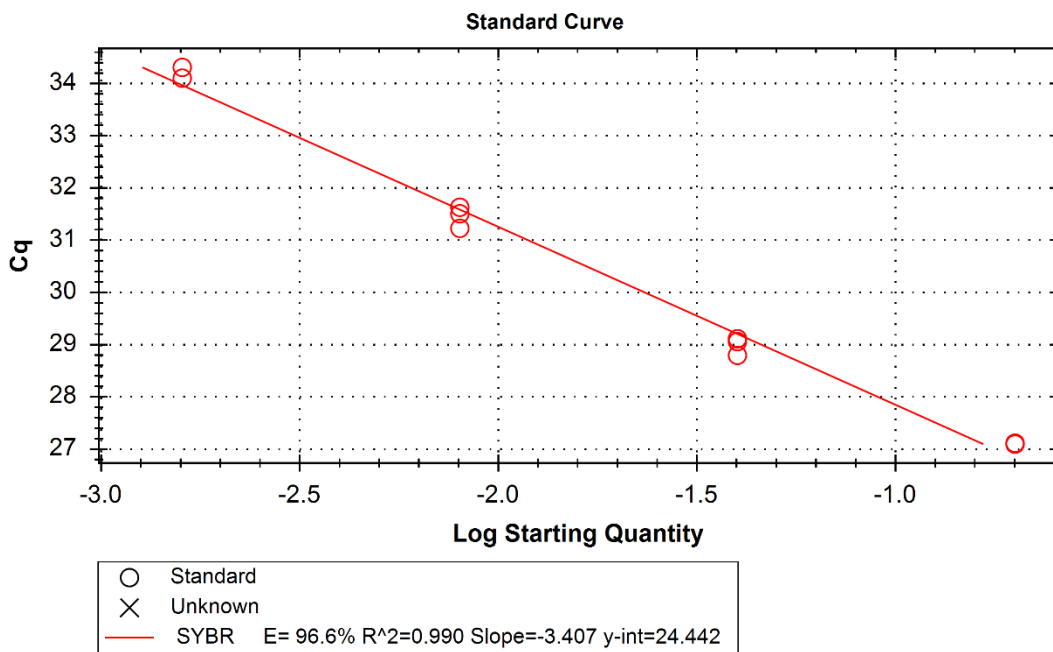


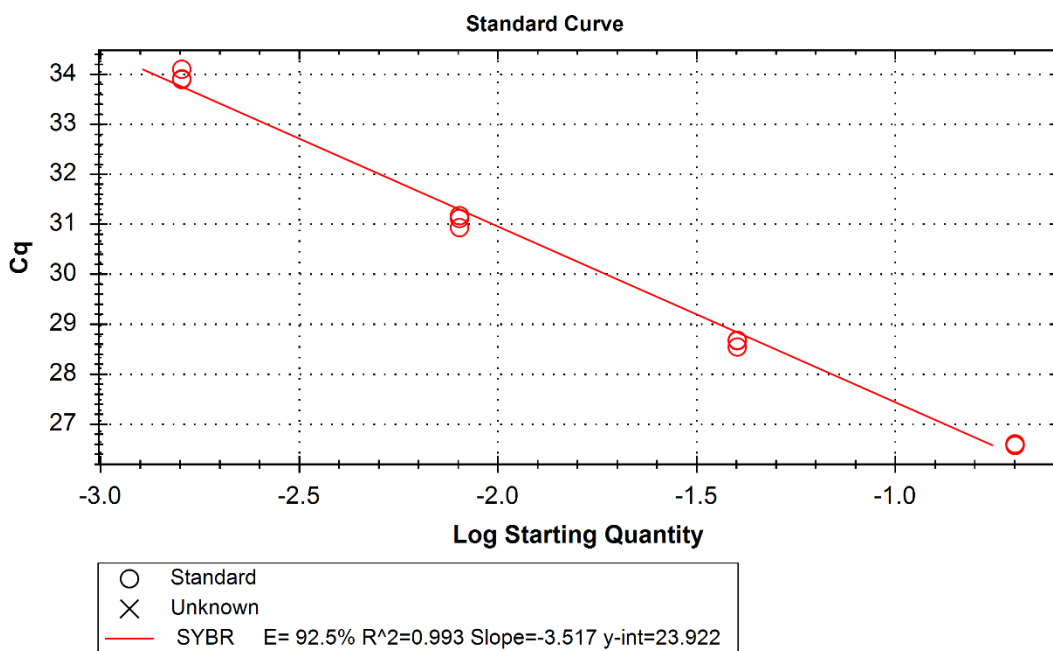
Figura 37. Curva de eficiencia del gen DDX5



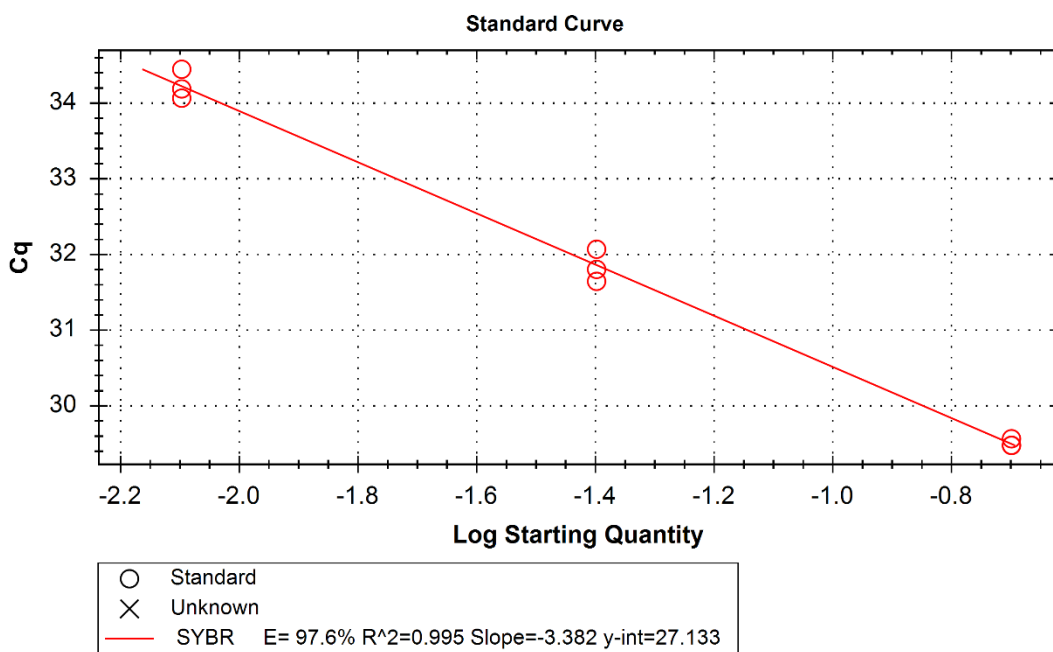
**Figura 38. Curva de eficiencia del gen FZD5.**



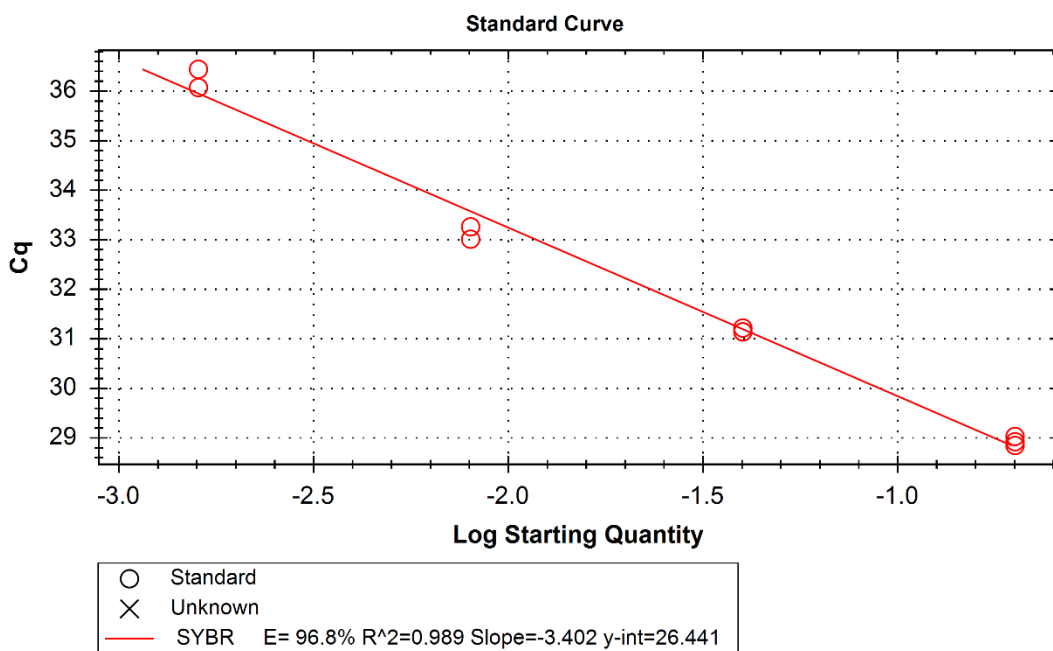
**Figura 39. Curva de eficiencia del gen LIPR1.**



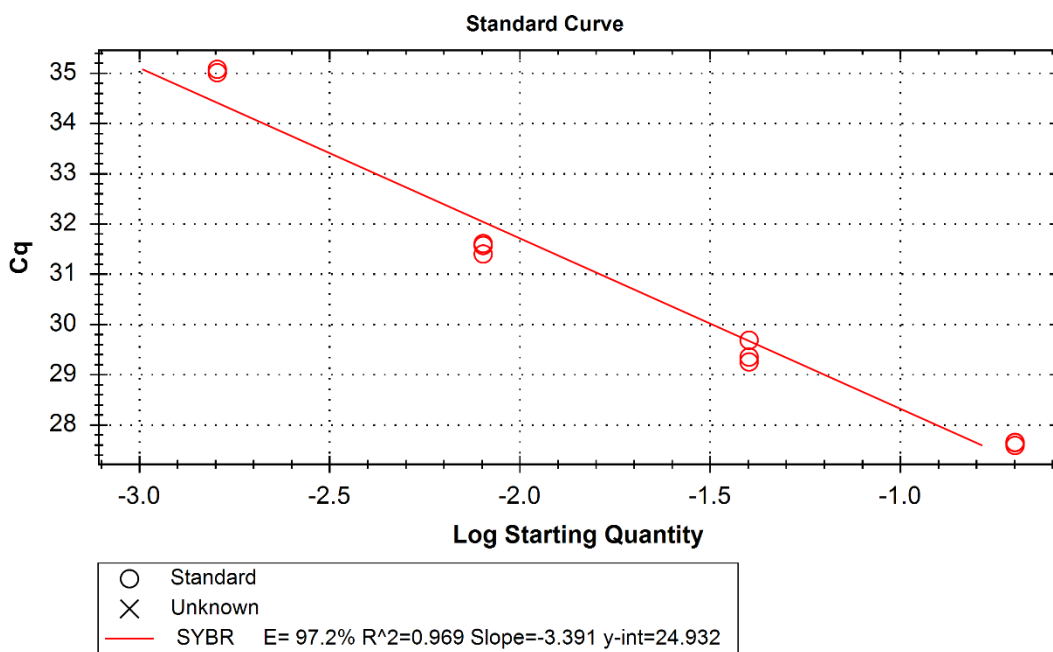
**Figura 40. Curva de eficiencia del gen M3K7.**



**Figura 41. Curva de eficiencia del gen P85A.**



**Figura 42. Curva de eficiencia del gen STDB1.**



**Figura 43. Curva de eficiencia del gen TEMPT.**