

Respuesta fisiológica y molecular de *Anadara tuberculosa* (Arcoïda: Arcidae) al estrés de salinidad

Oscar Mendoza¹, Krizia Pretell¹, Benoît Diringer^{2,4}, Ricardo Avellan³, Karina Zapata², Angelita Marchan¹, Virna Cedeño^{1,3}, Tessy Peralta¹, Alberto Ordinola¹ & Eric Mialhe^{2,3}

1. Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar, Universidad Nacional de Tumbes, Perú; omendozan@untumbes.edu.pe, krizmar_5@hotmail.com, tauro_27_193@hotmail.com, tesymar765@gmail.com, alordin@gmail.com, karinazapatavidaurre@gmail.com
2. Inca Biotec SAC, Perú; diringerb@yahoo.fr, ericmialhe@yahoo.fr
3. Concepto Azul AS, Ecuador; ravellan21@yahoo.com, virna.cedenoescoobar@gmail.com
4. EPHE, Pathologie Comparée des Invertébrés, Montpellier (France).

Recibido 27-VIII-2016. Corregido 27-IV-2017. Aceptado 31-V-2017.

Abstract: Physiological and molecular response of *Anadara tuberculosa* (Arcoïda: Arcidae) to salinity stress. The pustulose ark *A. tuberculosa* is an emblematic species of mangrove ecosystem that is currently in a vulnerable condition. The development of its aquaculture, to begin with genetic breeding programs, requires the identification of molecular biomarkers, particularly those associated with salinity stress. With this purpose, specimens of *A. tuberculosa* were collected from the adjacent mangroves of Puerto Pizarro bay (Tumbes, Perú), from January 2015 to February 2016. Different assays (groups of ten animals in triplicate) were undertaken in separated periods of 16 days: hypo-osmotic stress (extreme: 5, 10 ppt); (Moderate: 15, 25 ppt) and no stress (control group: 33 ppt). The presence of salinity stress biomarkers was assessed at the genetic level throughout PCR detection of 19 genes reported to be key actors in osmoregulation, and at the proteomic level with the sequencing of peptides (tandem mass spectrometry MALDI TOF/TOF), expressed in ark tissues exposed to different salinities. None of the tested genetic markers could be amplified by PCR, suggesting that *A. tuberculosa* has significant genetic differences compared to other mollusks. Proteomic analysis by mass spectrometry on *A. tuberculosa* gill tissue, allowed to identify 26 peptides expressed in presential and differential forms at different salinities, highlighting possible markers such as HSP70 and trans-membrane chloride channel transportation protein, to be related with salinity adaptation. These amino acid sequences will allow the design of target specific primers for *A. tuberculosa*, to implement future research in ecophysiology of this important fishery resource. Rev. Biol. Trop. 65 (3): 1142-1151. Epub 2017 September 01.

Key words: *Anadara tuberculosa*, osmoregulation, salinity, adaptation, mangrove.

Anadara tuberculosa (Sowerby, 1833), popularmente conocida en la región Tumbes como concha negra, es un molusco bivalvo perteneciente a la familia Arcidae, que se distribuye a lo largo de la costa del Océano Pacífico, desde Baja California, México hasta Tumbes, Perú (Espinosa, Delgado, Orobio, Mejía-Ladino, & Gil-Agudelo, 2010; Cruz, Fonseca, & Chavarría-Solera, 2012); habita la zona intermareal, asociada a los sustratos fangosos, arcillosos o limo-arcillosos del ecosistema de manglar (Mendoza & Peralta, 2004). Se

explota artesanalmente por extractores conocidos como “concheros” quienes sustentan parte de su economía con la extracción y venta de este molusco; sin embargo, la mayoría de los bancos naturales actualmente se encuentran sobreexplotados y algunas poblaciones, en la mayoría de los países, cercanas al colapso (Lucero, Cantera, & Neira, 2012). En Perú, las poblaciones de *A. tuberculosa* se han reducido en un 73.2 % durante el periodo de 1996 al 2007 (Ordinola, Montero, Alemán, & Llanos, 2007). Por este motivo, se están realizando

actividades alternativas como la producción de semillas en laboratorio, cuyas experiencias favorables han sido posibles en México, El Salvador, Perú y Ecuador. En Perú, el engorde en el manglar de semillas producidas en laboratorio ha sido un éxito, aunque con problemas de elevadas mortalidades, asociadas al descenso de la salinidad, en los meses de lluvia (Diringer, Vásquez, Moreno, Pretell, & Sahuquet, 2012; Pretell, 2015-comunicación personal).

A pesar de las diferencias de sensibilidad a variaciones de salinidades, todos los bivalvos son osmoconformes, es decir poseen poca o nula capacidad para la regulación osmótica de su hemolinfa, motivo por lo que, las células soportan la carga de la regulación del volumen ajustando las concentraciones intracelulares de amino ácidos libres (FAAs) y otras moléculas orgánicas pequeñas; sin embargo, los FAAs son principalmente obtenidos del catabolismo de proteínas (autofagia) cuya excesiva pérdida provoca la muerte del animal (Gosling, 2015). *A. tuberculosa* adultas, muestran gran adaptación a salinidades de 20 a 40 ppt, sin mortalidades asociadas (Nieves et al., 2009); pero experiencias realizadas sobre semillas de 5 mm, mostraron que a salinidades inferiores a 25 ppt provocan importantes mortalidades después de unos días (Diringer et al., 2012).

Los principales mecanismos de adaptación a diferentes salinidades de la ostra y del mejillón han sido caracterizados a nivel molecular (Cross, Merlo, Rodríguez, Portela-Bens, & Rebordinos, 2014; Eierman & Hare, 2014); en particular, Meng et al. (2013), resaltaron la primordial importancia de las vías de metabolismo de los FAAs para la adaptación eurihalina de la ostra *Crassostrea gigas*. A pesar que la mayoría de los trabajos han sido realizados en diferentes especies de bivalvos, es muy probable que los mecanismos de osmorregulación se conserven a nivel inter-específico. Recientemente, tecnologías de proteómica se han presentado como una alternativa para estudiar la respuesta de bivalvos frente a estrés abióticos (Artigaud et al., 2015; Rocher et al., 2015).

Por lo anterior, es que el objetivo de este trabajo fue determinar la respuesta fisiológica

y molecular de *A. tuberculosa* sometida a un estrés de baja salinidad. Adultos de *A. tuberculosa* fueron sometidos a salinidades de 5 a 33 ppt mediante desafíos experimentales de diferentes rangos de salinidad. Asimismo, en paralelo se caracterizó los genes asociados a la osmorregulación con técnicas de genómica y de proteómica comparativas, permitiendo caracterizar la respuesta de concha negra al estrés de salinidad, tanto en lo ecofisiológico como en lo molecular, para entender los mecanismos de adaptación, que permitirán a futuro seleccionar marcadores para programas de mejoramiento genético de este importante recurso en la Región Tumbes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Un total de 150 ejemplares de *A. tuberculosa* fueron recolectados entre agosto 2015 y enero 2016 en los bancos naturales del manglar colindante a la Bahía de Puerto Pizarro (3°30'12.96" S - 80°23'55.87" W), Tumbes, Perú. Los esteros que conforman este ecosistema poseen una salinidad de 33 ppt en marea alta, llegando a alcanzar una altura promedio de 1.20 m, con una fluctuación entre la alta y baja marea de 6 horas. Se seleccionaron los ejemplares que presentaban un tamaño ≥ 45 mm de longitud de valva para luego ser transportados al Centro Colectivo Educativo Experimental de Biología y Biotecnología Acuática y Acuicola de Puerto Pizarro (CEBAP).

Aclimatación y desafíos experimentales:

Se realizó un primer ensayo en agosto 2015. La parte ventral de la concha de los ejemplares seleccionados fue limada con la finalidad de que las branquias queden expuestas (Zhao, Yu, Kong, & Li, 2012). Posteriormente, todos ellos se aclimataron por 24 horas a 33 ppt de salinidad en agua de mar filtrada a $1\mu\text{m}$ y tratada (AMFT) con 10 ppm de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ y neutralizada con 0.9 ppm de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Transcurrido este periodo, se formaron grupos de diez animales por triplicado y se colocaron en recipientes con 20 litros de agua de mar previamente mezclada con diferentes proporciones de agua dulce

para obtener los diferentes grados de salinidad. Los individuos fueron directamente sometidos a condiciones de estrés hipo-osmótico (extremo: 5 y 10 ppt); (moderado: 15 y 25 ppt) y sin estrés (grupo control: 33 ppt). Las muestras fueron evaluadas por un periodo de 16 días con 100 % de recambio de agua cada 48 h, o en caso de presentar mortalidad. Los animales fueron alimentados durante el tiempo del bioensayo con un mix de microalgas (*Isocrysis* sp. y *Chaetoceros* spp.) a una concentración de 50 000 cel/mL de cada cepa, una vez al día. Estas muestras sirvieron para las evaluaciones genéticas.

En enero 2016, se realizó una segunda prueba utilizando el mismo procedimiento antes mencionado para la evaluación proteómica, con la diferencia de que los animales fueron expuestos solamente por periodos de 4, 8 y 12 horas, sin alimentación.

Extracción de ADN: Se usó 80 mg de tejido branquial macerado de *A. tuberculosa*, mediante el método de extracción CTAB 2 % (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio), complementado con proteinasa K (Gardes & Bruns, 1993). El ADN genómico se obtuvo con fenol, cloroformo y alcohol isoamil en proporción (25:24:1 v/v). Se precipitó con etanol frío al 95 %, y se realizó un lavado con etanol al 75 %. El ADN obtenido se resuspendió en 50 µL de buffer TE Tris/EDTA (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) y fue conservado a -20 °C.

Amplificación por PCR de genes de referencia y genes de interés: La calidad del ADN genómico se evaluó por amplificación del gen constitutivo mitocondrial COI con los iniciadores LCO (GGTCAACAAATCA-TAAAGATATTGG') y HCO (TAAACTTCA-GGG TGACAAA AAATCA). Los genes de interés evaluados para este estudio fueron: Aminomethyltransferase, Glycine dehydrogenase, Glycine hydroxymethyltransferase, Δ-1-pyrroline-5-carboxylate synthase, Ornithine aminotransferase, Arginase, Alanine transaminase, Alanine-glyoxylate transaminase, Glutamate decarboxylase, Glutamate decarboxylase

1-2, Spermidine synthase, Aldehyde dehydrogenase, ATP-grasp domain-containing protein, Cysteine sulfinic acid decarboxylase1-2, Taurine transporter, HSP beta 1, Sodium- and chloride-dependent glycine transporter (Meng et al., 2013; Cross et al., 2014; Eierman & Hare, 2014).

El mix de PCR "Thermo Scientific DNA Polymerase" (Invitrogen) contenía 15 pmol por cada juego de iniciador en un volumen final de 25 µL: Buffer de PCR (1X), Cl₂Mg (1.5 mM), taq polimerasa (2 U) y dNTPs (0.2 mM). Se utilizó un termociclador (Biometra UNO thermoblock) con una programación de 95 °C por 5 min para la desnaturalización inicial; 35 ciclos a 94 °C por 30 s; para la desnaturalización, 50 °C por 45 s para la hibridación y 72 °C por 45 s para la polimerización. Se usó como control positivo ADN extraído a partir de branquias de *Crassostrea gigas*.

Extracción de proteínas a partir de tejido branquial: Fragmentos de la parte blanda de las branquias fueron extraídas a las 4, 8 y 12 horas de exposición a partir de animales expuestos y aclimatados a salinidades de 0, 5, 15 y 25 ppt, y almacenadas en PMSF 0.1 mM (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) a -20 °C. Para la extracción de proteínas se utilizó el método PBS 1X (buffer fosfato salino), con 1 mM de PMSF, y se usó como agentes de precipitación TCA (ácido tricloroacético) con acetona para luego ser resuspendido en 100 µL de buffer de rehidratación (Agua grado HPLC/0.1 % TFA Ácido trifluoroacético), almacenándolo a -20 °C.

Migración en SDS page y visualización de bandas: Las proteínas purificadas fueron luego tratadas según el protocolo descrito por Shevchenko, Henrik, Jan, Jesper y Matthias (2006). Brevemente, de la muestra anterior se tomó 25 µL y se mezcló con 10 µL de buffer de carga (1M de Tris pH 6.8, 10 % SDS, 10 % glicerol, 0.02 % azul de bromofenol, 0.71 M DTT y agua bidestilada) a 2x. Se llevó a migrar en gel SDS PAGE al 12 %. Las bandas de interés fueron extraídas y digeridas. Las muestras fueron hidratadas con agua grado HPLC

con TCA y se les adicionó el mismo volumen de matriz CHCA, se homogenizó cuidadosamente y fue colocada en el spot de la Opti-TOF® sample plate.

Análisis proteómico por espectrometría de masas: A través de un espectrómetro de masa MALDI TOF/TOF MS Analyzer 5800 (Applied Biosystems) en modo MS Linear High Mass Positive y MS Reflector Positive con un láser Nd:YAG de λ a 335 nm, frecuencia 200 Hz. La placa Opti-Tof fue calibrada en un rango de 800-1 800 m/z utilizando una mezcla de calibrantes, los espectros se obtuvieron con 500 disparos con 3 200 U internas de intensidad de láser en un rango de 600-4 000 m/z. En modo TOF/TOF, los iones fueron acelerados a 8 kV y el análisis se realizó usando el programa 4000 Series Explorer versión 3.5.3 (Applied Biosystem). Se usó los iones de autólisis de

la tripsina 842,510 m/z y 2 211,105 m/z para calibración interna del equipo.

RESULTADOS

Efecto de cambios de salinidad sobre *A. tuberculosis*: No se reportó mortalidades en los tratamientos con salinidades de 15 a 33 ppt durante el periodo evaluado. El primer ejemplar muerto apareció al tercer día a 5 ppt; luego, la disminución de supervivencia fue progresiva, hasta que el último animal murió a los 15 días del ensayo. La mortalidad a 10 ppt inició a los 12 días, pero fue más severa con la desaparición del 90 % de los ejemplares a los cuatro días. Se observó mortalidades en los adultos mantenidos a una salinidad de 20 ppt después de 18 días.

Desde un punto de vista de comportamiento, los animales expuestos a salinidades

CUADRO 1

Resultados de las amplificaciones de genes que intervienen en la síntesis de aminoácidos libres obtenidos por PCR en este estudio

TABLE 1

Amplification results of genes involved in the synthesis of free amino acids obtained by PCR in this study

N°	Gen evaluado	Especie	
		<i>A. tuberculosis</i>	<i>C. gigas</i>
1	Cytochrome c oxidase subunit I (COI)	Positivo	Positivo
2	Aminomethyltransferase	Negativo	Positivo
3	Glycine dehydrogenase	Negativo	Positivo
4	Glycine hydroxymethyltransferase	Negativo	Negativo
5	Δ -1-pyrroline-5-carboxylate synthase	Negativo	Negativo
6	Δ 1 -pyrroline-5-carboxylate reductase	Negativo	Positivo
7	Ornithine aminotransferase	Negativo	Positivo
8	Arginase	Negativo	Positivo
9	Alanine transaminase	Negativo	Positivo
10	Alanine-glyoxylate transaminase 2	Negativo	Positivo
11	Glutamate decarboxylase	Negativo	Positivo
12	Glutamate decarboxylase	Negativo	Positivo
13	Spermidine synthase	Negativo	Positivo
14	Aldehyde dehydrogenase	Negativo	Positivo
15	Cysteine sulfinic acid decarboxylase	Negativo	Positivo
16	Cysteine sulfinic acid decarboxylase	Negativo	Positivo
17	Taurine transporter	Negativo	Positivo
18	Sodium- and chloride-dependent glycine transporter	Negativo	Positivo
19	ATP-grasp domain-containing protein	Negativo	Positivo
20	HSP beta	Negativo	Positivo

hipo-osmóticas extremas (5 y 10 ppt), cerraron las valvas y la filtración del alimento fue mínima. A partir del tercer día presentaron una motilidad aletargada y daño en el tejido branquial, así también, desangramiento parcial. Los animales expuestos a estrés hipo-osmótico moderado 15 ppt y 25 ppt, así como el control a 33 ppt, presentaron actividad frecuente (movilidad, alimentación), y formación de biso.

Amplificación de genes osmoreguladores: En este estudio se evaluó la presencia de 19 genes asociados a la osmorregulación en ostras y mejillones (Cuadro 1). De estos, se evidenció que 15 son enzimas claves del metabolismo de los FAAs (2 al 16), tres son transportadores de los principales FAAs (17 al 19), uno está relacionado al mecanismo de estrés (20), y se incluyó un control positivo que había sido utilizado en estudios anteriores sobre *A. tuberculosa* (1).

De todos los genes evaluados, el gen COI fue el único en ser amplificado mediante PCR en *A. tuberculosa*, lo que valida la calidad de la extracción de ADN para este molusco. Luego, 18 de los 20 genes fueron exitosamente amplificados para la muestra de *C. gigas*, incluyendo el gen COI, lo que validó también los protocolos de amplificación de la mayoría de los genes, pero Δ -1-pyrroline-5-carboxylate synthase y Glycine hydroxymethyltransferase fueron los únicos que no amplificaron.

Estos resultados evidencian diferencias, al menos a nivel genómico, de los genes involucrados en la osmorregulación de *A. tuberculosa* con *C. gigas*.

Identificación de secuencias peptídicas:

De los individuos expuestos a salinidades de 0, 5, 15 y 25 ppt durante la segunda evaluación, se extrajo proteínas a partir de las branquias. Se obtuvo un total 26 secuencias, de las cuales

CUADRO 2

Péptidos biomarcadores putativos del sistema de osmorregulación de *A. tuberculosa* sometida a diferentes condiciones de estrés identificados en la presente investigación

TABLE 2

Peptides putative biomarkers of the osmoregulation system of *A. tuberculosa* under various stress conditions identified in this research

Secuencia	Proteína putativa	Función	Tipo
VSITSK	actin-binding protein anillin-like isoform X4	Proteínas involucradas en la localización del núcleo durante la interfase y la citokinesis.	Presencial
DPVLFNR	cytochrome c oxidase subunit I	Enzima clave en el metabolismo aeróbico. Involucrado en la respuesta a metales pesados en moluscos.	Presencial
WLTSK	sn1-specific diacylglycerol lipase beta-like isoform X1	Involucrado en sistema nervioso. Cataliza la hidrólisis de diacilglicerol (DAG) a 2-araquidonoil-glicerol (2-AG), el endocannabinoide más abundante en los tejidos.	Presencial
GHLCR	secretin receptor-like	La familia del receptor a secretina activa las vías de adenilato ciclasa y de fosfatidil-inositol-calcio.	Diferencial 0 y 5 ppt
WVDSK	Beta-1,3-glucan-binding protein	Proteína de reconocimiento de lipopolysaccharides y β -1, 3-glucan, que active la cascada proPO cascade en artrópodos, juega un papel esencial en respuesta inmune.	Diferencial 0 y 5 ppt
TTLTSK	integumentary mucin C.1-like	Precursor de proteínas secretadas (mucus) en ranas.	Diferencial 0 y 5 ppt
LPPCR	General transcription factor 3C polypeptide 5	Implicado en la transcripción mediada por la ARN polimerasa 3. Componente, fuertemente asociado a la proteína TFIIC 2 que se une directamente ARNt y a promotores asociados a virus de ARN.	Presencial

CUADRO 2 (Continuación) / TABLE 2 (Continued)

Secuencia	Proteína putativa	Función	Tipo
NPIDFVR	deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1-like	Nucleasa de restricción que bloquea la replicación de virus en etapa temprana en dendritos y otras células mieloides. Del mismo modo, suprime a retrotransposones. Podría actuar en la mediación de respuestas proinflamatorias.	Presencial
VLKPKFDFR	40S ribosomal protein S3a	Componente de la subunidad del pequeño ribosoma.	Presencial
QTSKMR	tRNA (uracil-5-)-methyltransferase-like protein A	Metiltransferasa del ARNt.	Presencial
CFTSK	Synaptobrevin, partial	Pertenece a las proteínas SNARE que son componentes clave de la fusión de las membranas en la exocitosis. Su función, sin embargo está sujeto a un ajuste efectuado por varias proteínas reguladoras que se refiere colectivamente como maestros SNARE.	Diferencial 0 y 5 ppt
VVVVSK	cytochrome b-245 heavy chain-like, partial	En la mitocondria de eucariotas y en procariontes aeróbicos , el citocromo b es un componente del complejo de la cadena respiratoria II. Estos complejos están involucrados en el transporte de electrones y el bombeo de protones.	Presencial
GELTSK	chloride channel protein 2-like isoform X2	Proteína del canal de cloruro que regulan el volumen celular; el potencial de membrana, la transducción de señales y el transporte trans epitelial.	Presencial
EITSK	adenosylmethionine synthase isoform type-2-like isoform X3	Cataliza la formación de S-adenosilmetionina a partir de metionina y ATP.	Presencial
GQITSK	glycine N-acyltransferase-like [<i>Crassostrea gigas</i>]	Aciltransferasa que transfiere un grupo acilo a la N-terminal de la glutamina. Puede utilizar fenilacetil-CoA como donador de acilo. Identificada del genoma de ostra <i>C. gigas</i> .	Presencial
HGITSK	EF-hand calcium-binding domain-containing protein 6-like isoform X3 [<i>Crassostrea gigas</i>]	El motivo de mano EF es el motivo de unión al calcio más común encontrado en las proteínas, está probablemente involucrada en la relajación muscular a través de su actividad de unión a calcio.	Diferencial 0 y 5 ppt
DADVSK	trichohyalin-like	Trichohalina confiere resistencia mecánica al folículo del pelo y a otros tejidos epiteliales. Está involucrado en los velos sensoriales de moluscos.	Diferencial 0 y 5 ppt
ETVFDLR	multidrug resistance-associated protein 4-like	Bomba de desintoxicación celular. Reportada para eliminación de toxinas en moluscos depredadores.	Diferencial 0 y 5 ppt
ELTSK	Tripartite motif-containing protein 3	Probablemente implicados en el tráfico vesicular a través de su asociación con el complejo de CART. Identificada del genoma de ostra <i>C. gigas</i> .	Diferencial 0 y 5 ppt
GIGCEWR	Krüppel-like factor 5	La familia Krüppel-como de factores de transcripción (FCE) son un conjunto de proteínas de unión al ADN de dedos de zinc que regulan la expresión génica.	Presencial
LEGTNT	heat shock 70 kDa protein 12A-like	Proteínas de choque térmico (HSP) son una familia de proteínas chaperonas que son producidas por las células en respuesta a la exposición a condiciones de estrés y durante la curación de heridas o la remodelación tisular. Varias son descriptas en bivalvos.	Presencial
EGLTSK	Uncharacterized protein C7orf58	Función desconocida.	Presencial
AMVDTN	Rotatin	Grande proteína de función desconocida.	Diferencial 0 y 5 ppt

CUADRO 2 (Continuación) / TABLE 2 (Continued)

Secuencia	Proteína putativa	Función	Tipo
LVAVRDVPRPR	gelsolin-like protein, partial	La gelsolina es una proteína de unión a actina que es un regulador clave del ensamblamiento y desensamblamiento de filamentos de actina. Gelsolin se encuentra intracelularmente (en citosol y mitocondrias) y extracelularmente (en el plasma sanguíneo).	Presencial
VSLTSK	pyruvate kinase	Esta enzima está implicada en la última etapa de la glucólisis para catalizar la fosforilación de una molécula de ADP en ATP.	Diferencial 0 y 5 ppt
HGLCR	Serine/threonine-protein kinase SRPK1	Este gen codifica una de serina arginina quinasa. La proteína se localiza en el núcleo y el citoplasma. Se cree que desempeñan un papel en la regulación del episaje constitutivo y alternativo.	Presencial

10 se expresaron únicamente en los individuos mantenidos a 0 y 5 ppt (diferencial), y 16 expresadas en todos los grupos (presencial) (Cuadro 2). De todas estas, se encontró que dos están relacionadas al mecanismo de osmorregulación en invertebrados marinos. La primera secuencia corresponde a un fragmento de una heat shock protein de 70 Kda (HSP70), que se encontró de manera presencial en todas las muestras a diferentes salinidades, cualitativamente la HSP70 presentó una mayor expresión a 0 y 5 ppt, cuando se comparaba las intensidades de las bandas extraídas del gel de SDS Page. Por su parte, la segunda corresponde a una secuencia de seis péptidos, que pertenecen a canales de cloro (chloride channel protein), que aparece como un candidato válido del mecanismo de osmoregulación para la concha negra *A. tuberculosa*.

DISCUSIÓN

La comprensión de los mecanismos por los cuales los organismos pueden adaptarse a los desafíos ambientales y los factores que limitan sus capacidades de distribución, han sido durante mucho tiempo la interrogante de la biología. La supervivencia de los organismos marinos requerirá la aclimatación y adaptación a estas variantes ambientales. En el ecosistema manglar de Tumbes, donde habita el bivalvo *A. tuberculosa* existen eventos de descensos bruscos de salinidad, que suelen acontecer principalmente durante el verano

con la entrada de agua dulce. En estas zonas de encuentro, la salinidad puede disminuir drásticamente en un lapso de unas horas y hasta ser completamente dulce durante las mareas bajas (Nieves et al., 2009).

El presente trabajo complementa los resultados obtenidos por Nieves et al. (2009), quienes evaluaron por 15 días al bivalvo *A. tuberculosa*, y mostraron crecimiento en adultos mantenidos entre 20 a 50 ppt de salinidad a distintas temperaturas, concluyendo que las salinidades altas (40 a 50 ppt) perjudican el crecimiento, y que las condiciones óptimas de cultivo son 20 ppt y 32 °C. Sin embargo, al finalizar estos experimentos, los individuos que se mantuvieron a salinidades de 20 ppt mostraron mortalidades después de 18 días (resultados no mostrados). Por otro lado, los resultados de Diringer et al. (2012) quienes evaluaron la supervivencia de semillas de *A. tuberculosa* producidas en laboratorio y mantenidas de 45 a 0 ppt por 20 días, demostraron que la supervivencia fue severamente afectada a salinidades inferiores o igual a 20 ppt (100 % de mortalidad entre 2 a 11 días) y moderadamente afectadas a salinidad de 45 ppt (20 % de mortalidad a los 18 días). En conjunto, estos resultados demuestran que *A. tuberculosa* es una especie eurihalina. Se sugiere que la supervivencia a salinidades inferiores o iguales a 20 ppt está relacionada a la capacidad del bivalvo a reajustar su volumen celular a través de la excreción de FAAs, que y que depende de las reservas energéticas inicial de cada individuo,

tal como lo menciona Gosling (2015). Esta hipótesis se ajusta a los resultados obtenidos con semillas de *A. tuberculosa* que poseen menos reservas o que poseen un desgaste más acelerado que un adulto.

Estudios previos han demostrado que los FAAs intracelulares son los principales contribuyentes a la regulación de la osmolaridad intracelular y del volumen celular en bivalvos (Gosling, 2015). En este trabajo se diseñó 18 marcadores moleculares asociados al sistema de regulación por FAAs, y uno a partir de la proteína de estrés (HSP70), usando las secuencias disponibles publicadas de cuatro bivalvos modelos: las ostras *C. gigas*, *C. angulata*, *C. virginica* y el mejillón *M. galloprovincialis* (Meng et al., 2013; Cross et al., 2014; Eierman & Hare, 2014).

La utilización de dos controles positivos (COI para bivalvos y ADN de ostras) permitió confirmar que la ausencia de amplificación de los genes evaluados se debe o a diferencias genéticas en las regiones conservadas evaluadas, o a la ausencia de estos genes en *A. tuberculosa*. La primera hipótesis aparece como la más probable debido al predominio del sistema de osmorregulación mediante la utilización de FAAs en bivalvos y gasterópodos marinos; así como, porque importantes diferencias a nivel genético, en particular en los genes asociados a mecanismos de respuestas a estrés abióticos, se encontraron entre las secuencias nucleotídicas de *C. angulata* y *C. virginica* con *C. gigas* (Cross et al., 2014; Eierman & Hare, 2014).

Existen diferentes alternativas para a futuro identificar a nivel nucleotídico los genes específicos involucrados en la osmoregulación en *A. tuberculosa*. Los trabajos realizados a nivel genómico o transcriptómico por Cross et al. (2014), o Meng et al. (2013) y Eierman y Hare (2014) en ostras, abrieron el camino para la identificación de marcadores genéticos específicos de bivalvos, mediante la aplicación de herramientas de Next Generation Sequencing (NGS) y podrían ser aplicados a *A. tuberculosa*. Es importante resaltar un estudio realizado por Barman et al. (2012) en el camarón *Macrobrachium rosenbergii*, que evaluó la expresión

de ARNm del crustáceo expuesto a diferentes salinidades, por transcriptómica diferencial, mediante la técnica de Hibridación Substractiva y Supresiva (SSH), que permite resaltar a los transcritos más discretos.

Como alternativa al trabajo genético, se exploró el proteoma diferencial de *A. tuberculosa* sometida a diferentes salinidades, lográndose identificar a 16 proteínas “presenciales” y 10 proteínas expresadas de forma diferenciales (38.5 %) al control, mediante separación por electroforesis SDS PAGE 1D. El único trabajo similar realizado en bivalvos fue presentado por Tomanek, Zuzow, Hitt, Serafini, y Valenzuela Tomanek, (2012) que compararon la respuesta al estrés hipo-osmótico en dos especies de mejillón. A pesar de que este equipo obtuvo más proteínas aisladas gracias a un sistema de separación SDS PAGE 2D, la proporción de proteínas diferenciales fue de 29 % para *M. galloprovincialis* y 39 % para *M. trossulus*, lo que está dentro del rango del presente estudio.

La familia de HSP es comúnmente encontrada en moluscos sometidos a estrés abióticos y ha sido reiteradamente propuesta como biomarcador (Gracey et al., 2008; Yang et al., 2014; Patterson, Boettcher, & Carmichael, 2014; Liu, He, Chi, & Lv, 2015; Shiel, Hall, Cooke, Robinson, & Strugnell, 2015). En este trabajo se intentó sin éxito amplificar por PCR una región conservada de esta chaperona, mientras que esta proteína pudo ser detectada mediante proteómica, esto se debe al carácter muy variable de HSP70 que presenta mucha variabilidad intra e inter específica, tal como lo menciona Yang et al. (2014).

El canal a cloro encontrado en *A. tuberculosa*, presentó grandes similitudes con una proteína de *C. gigas* (chloride channel protein 2-like isoform X2) sometida a condiciones de estrés de salinidad (Damiens et al., 2006). Estos canales cumplen una variedad de importantes roles celulares y fisiológicos entre los que se encuentran la regulación del pH, regulación del volumen en la homeostasis, transporte de solutos orgánicos, migración celular y diferenciación por lo que parece como un candidato

válido del mecanismo de osmoregulación para *A. tuberculosa*.

La no amplificación de los genes evaluados por PCR revela diferencias genéticas entre *A. tuberculosa* y los bivalvos previamente estudiados (*C. gigas*, *C. angulata*, *O. edulis* y *M. galloprovincialis*), sin poder determinar si estas corresponden a diferencias nucleotídicas de las regiones conservadas, o por la ausencia de estos genes en *A. tuberculosa*.

Las secuencias aminoácidas obtenidas por espectrometría de masas identificaron HSP 70, canal de cloro, y al piruvato kinasa como posibles biomarcadores del sistema de osmoregulación en *A. tuberculosa*, y permitirán diseñar iniciadores específicos para la puesta en marcha de futuros programas de mejoramiento genético de este importante recurso.

AGRADECIMIENTOS

El presente estudio fue posible gracias al aporte de financiamientos por parte de la Universidad Nacional de Tumbes a través del proyecto CANON Resolución N° 00723-2014/UNT-R., K.P y V.C. recibieron una beca de CONCYTEC (CONVENIO DE GESTIÓN N° 015-2013- FONDECYT, y R.P.N° 206-2013-CONCYTEC-P.), y B.D de la Escuela Doctoral Franco-Peruana en Ciencias de la Vida.

RESUMEN

La concha negra *Anadara tuberculosa* es una especie emblemática del ecosistema manglar que está actualmente en condición vulnerable. El desarrollo de su acuicultura requiere identificar biomarcadores moleculares, en particular asociados al estrés por salinidad en mira al inicio de programas de mejoramiento genético. Se recolectaron ejemplares de *Anadara tuberculosa* del manglar colindante a la Bahía de Puerto Pizarro (Tumbes, Perú) entre enero 2015 y febrero 2016. Estos individuos fueron sometidos a condiciones de estrés hipo-osmótico (extremo: 5 y 10 ppt); (moderado: 15 y 25 ppt) y sin estrés (grupo control: 33 ppt) por 16 días después de haber sido separados en grupos de diez animales y por triplicado. La presencia de biomarcadores del estrés por salinidad fue evaluada a nivel genético con la detección por PCR de 19 genes reportados como actores claves de la osmoregulación en bivalvos

como ostras y mejillones y a nivel proteómico con la secuenciación de péptidos expresados en tejidos de animales expuestos a diferentes salinidades por espectrometría de doble masa. Ninguno de los marcadores genéticos probados pudo ser amplificado por PCR lo que sugiere que *A. tuberculosa* presente diferencias genéticas significativas en comparación con otros moluscos. El análisis proteómico realizado por MALDI TOF/TOF a nivel de tejido branquial de *A. tuberculosa* permitió identificar 26 péptidos expresados de formas presenciales y diferenciales a las diferentes salinidades evaluadas, resaltando posibles marcadores como la HSP70 y una proteína transmembrana de transporte de cloruro que están relacionadas con la adaptación a la salinidad. Estas secuencias aminoácidas permitirán diseñar iniciadores nucleotídicos específicos a *A. tuberculosa* para la puesta en marcha de futuras investigaciones en ecofisiología de este importante recurso.

Palabras clave: *Anadara tuberculosa*, osmoregulación, salinidad, adaptación, manglar.

REFERENCIAS

- Artigaud, S., Lacroix, C., Richard, J., Flye-Sainte-Marie, J., Bargelloni, L., & Pichereau, V. (2015). Proteomic responses to hypoxia at different temperatures in the great scallop (*Pecten maximus*). *PeerJ*, 3, e871. doi: 10.7717/peerj.871
- Barman, H. K., Patra, S. K., Das, V., Mohapatra, S. D., Jayasankar, P., Mohapatra, Ch., Mohanta, R., Panda, R. P., & Rath, S. N. (2012). Identification and Characterization of Differentially Expressed Transcripts in the Gills of Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) under Salt Stress. *The Scientific World Journal*, doi:10.1100/2012/ 149361
- Cruz, R., Fonseca, R. & Chavarria-Solera, F. (2012). Comparación de la composición química proximal de la carne de *A. tuberculosa* y *A. similis* (Bivalvia: Arcidae) de Chomes, Puntarenas, Costa Rica. *Revista de Ciencias Marinas y Costeras*, 4, 95-103. Recuperado de <http://www.revistas.una.ac.cr/index.php/revmar/article/view/4801>
- Cross, I., Merlo, M., Rodríguez, M. E., Portela-Bens, S., & Rebordinos, L. (2014). Adaptation to abiotic stress in the oyster *Crassostrea angulata* relays on genetic polymorphisms. *Fish Shellfish Immunology*, 41(2), 618-24. doi: 10.1016/j.fsi.2014.10.011
- Damiens, G., Mouneyrac, C., Quiniou, F., His, E., Gnassia-Barelli, M., & Roméo, M. (2006). Metal bioaccumulation and metallothionein concentrations in larvae of *Crassostrea gigas*. *Environmental Pollution*, 140(3), 492-9, doi: 10.1016/j.envpol.2005.08.006
- Diringer, B., Vasquez, R., Moreno, V., Pretell, K., & Sahuquet, M. (2012). Peru Project Studies Blood cockles for stock enhancement, Aquaculture. *Global*

- Aquaculture Advocate*, Ju-Agt, 48-50. Recuperado de <http://pdf.gaalliance.org/pdf/GAA-Diringer-July12.pdf>.
- Eierman, L. E., & Hare, P. M. (2014). Transcriptomic analysis of candidate osmoregulatory genes in the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Bio Med Central Genomics*, 15, 503, doi: 10.1186/1471-2164-15-503
- Espinosa, S. G., Delgado, M. H., Orobio, B. R., Mejía-Ladino, L. & Gil-Agudelo, D. (2010). Estado de la población y valoración de algunas estrategias de conservación del recurso piangua *Anadara tuberculosa* (Sowerby) en sectores de Bazán y Nerete, costa pacífica nariense de Colombia. *Boletín Investigación Marina Costera*, 39(1), 161-176. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/mar/v39n1/v39n1a09.pdf>
- Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – applications to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2, 113-118. Recuperado de <https://nature.berkeley.edu/brunslab/papers/gardes1993.pdf>
- Gosling, E. (2015). *Marine Bivalve Molluscs* (2nd ed). Oxford, U.K.: Editorial offices.
- Gracey, Y., Chaney, M. L., Boomhower, J. P., Tyburczy, W. R., Connor, K., & Somero, G. N. (2008). Rhythms of Gene Expression in a Fluctuating Intertidal Environment. *Current Biology*, 18, 1501-1507, doi:10.1016/j.cub.2008.08.049
- Liu, H., He, J., Chi, C., & Lv, Z. (2015). Identification and analysis of HSP70 from *Sepiella maindroni* under stress of *Vibrio harveyi* and Cd²⁺. *Epub 1*, 572(1), 146-52. Recuperado de <http://dx.doi.org.sci-hub.bz/10.1016/j.gene.2015.07.056>
- Lucero, C., Cantera, J., & Neira, R. (2012). Pesquería y crecimiento de la piangua (Arcoïda: Arcoidae) *Anadara tuberculosa* en la Bahía de Málaga del Pacífico colombiano, 2005-2007. *Revista Biología Tropical*, 60(1), 203-217.
- Mendoza, O. & Peralta, T. (2004). Primeros ensayos sobre reproducción inducida y obtención de semillas de *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833) en laboratorio. *Revista Manglar*, 2(1), 87-94.
- Meng, J., Zhu, Q., Zhang, L., Li, Ch., Li, L., She, Z., Huang, B., & Zhang, G. (2013). Genome and Transcriptome Analyses Provide Insight into the Euryhaline Adaptation Mechanism of *Crassostrea gigas*. *PLoS One*, 8(3), e58563, doi: 10.1371/journal.pone.0058563
- Nieves, M., Román, J. C., Piña, P., Medina, A., Leal, S., Miranda, A., & Muñoz, G. (2009). Balance energético de *Anadara tuberculosa* (SOWERBY, 1833) a diferentes temperaturas. *Revista de Investigaciones Marinas*, 30, 135-144. Recuperado de <http://www.rim.uh.cu/index.php/IM/article/viewFile/131/130>
- Ordinola, E., Montero, P., Alemán, S., & Llanos, J. (2007). Prospección del recurso concha negra (*Anadara tuberculosa*) en los manglares de Tumbes. Tumbes: IMARPE.
- Patterson, K., Boettcher, A., & Carmichael, R. (2014). Biomarkers of dissolved oxygen stress in oysters: a tool for restoration and management efforts. *PLoS One*, 12, 9, e104440. doi: 10.1371/journal.pone.0104440
- Rocher, B., Bultelle, F., Chan, Ph., Le Foll, F., Letendre, J., Monsinjon, T., Olivier, S., ... & Knigge, T. (2015). 2-DE Mapping of the Blue Mussel Gill Proteome: The Usual Suspects Revisited. *Proteomes*, 3(1), 3-41, doi: 10.3390/proteomes3010003
- Shevchenko, A., Henrik, T., Jan, H., Jesper, V., & Matthias, M. (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*, 6(1), 2856-2860. doi: 10.1038/nprot.2006.468
- Shiel, B., Hall, N., Cooke, I., Robinson, N., & Strugnell, J. (2015). De novo characterisation of the greenlip abalone transcriptome (*Haliotis laevis*) with a focus on the heat shock protein 70 (HSP70) family. *Marine Biotechnology (NY)*, 17(1), 23-32. doi: 10.1007/s10126-014-9591-y
- Tomanek, L., Zuzow, M. J., Hitt, L., Serafini, L., & Valenzuela, J. J. (2012). Proteomics of hyposaline stress in blue mussel congeners (genus *Mytilus*): implications for biogeographic range limits in response to climate change. *The Journal of Experimental Biology*, 215, 3905-3916. doi:10.1242/jeb.076448
- Yang, C., Wang, L., Wang, J., Jiang, Q., Qiu, L., Zhang, H., & Song, L. (2014). The polymorphism in the promoter of HSP70 gene is associated with heat tolerance of two congener endemic bay scallops (*Argopecten irradians irradians* and *A. i. concentricus*). *PLoS One*, 9(7), e102332. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4100766/pdf/pone.0102332.pdf>
- Zhao, X., Yu, H., Kong, L., & Li, Q. (2012). Transcriptomic responses to salinity stress in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *PLoS One*, 7(9), e46244, doi: 10.1371/journal.pone.0046244