

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**



TÍTULO:

**“EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DE LA INFECCIÓN  
EXPERIMENTAL DEL OSTIÓN DEL PLACER *Crassostrea corteziensis* Y  
OSTIÓN AMERICANO *Crassostrea virginica* CON EL PROTOZOARIO  
PARÁSITO *Perkinsus marinus*”**

PRESENTA:

**M.C. JESÚS NEFTALÍ GUTIÉRREZ RIVERA**

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN DE TESIS  
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

MAYO, 2014.

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E INMUNOLOGIA**

**TÍTULO:**

**“EVALUACION DE LA RESPUESTA INMUNE DE LA INFECCION  
EXPERIMENTAL DEL OSTION DEL PLACER *Crassostrea corteziensis* Y  
OSTION AMERICANO *Crassostrea virginica* CON EL PROTOZOOARIO  
PARASITO *Perkinsus marinus*”**

**COMISIÓN DE TESIS**

**Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal**

Directora Interna

**Dr. Ricardo Vázquez Juárez**

Director Externo

**Dra. Dvorak Montiel Condado**

Secretaria

**Dr. Juan Manuel Alcocer González**

Vocal 1

**Dra. Yolanda Gutiérrez Puente**

Vocal 2

Mayo, 2014.

El presente trabajo fue financiado por CONACYT México, por el Proyecto 106887 “Enfermedades emergentes causadas por protozoarios y su efecto inmunosupresor en moluscos bivalvos del noroeste de México”.

Investigador responsable: Dr. Ricardo Vázquez Juárez.

## AGRADECIMIENTOS

El autor agradece a la Dra. Elva Teresa Archiga Carvajal y al Dr. Ricardo Vázquez Juárez por todo apoyo ofrecido durante la realización de este trabajo.

Dr. Lenin Arias y Dr. Antonio Luna por las facilidades para realizar el experimento. Al personal del departamento de CIIDIR en especial al M en C. Jesús Arturo Fierro Coronado, investigadores y estudiantes que fueron de valiosa ayuda.

Dra. Martha Gomez Chiarrí de la Universidad de Rhode Island, por el entrenamiento en el cultivo del parásito, así como a sus estudiantes quienes siempre me extendieron su ayuda.

CIBNOR La Paz, compañeros técnicos e investigadores que me facilitaron el acceso a las instalaciones haciendo el análisis de las muestras mucho más fácil. La Dra. Cristina Escobedo, por el apoyo durante el cultivo de *P. marinus*. Dra. Alejandra García Gasca, siempre agradecido por estar presente cuando más le he requerido.

Especial agradecimiento al Dr. Eduardo Franco por el enorme apoyo, el cual siempre me dió durante mis estancias en Monterrey y por los innumerables trámites que realizó por mí ante la universidad. Imposible no dar las gracias al Dr. “Pepe” Vázquez quién igualmente me extendió la mano en todo momento. Dr. Jorge Ramírez gracias por los consejos y regaños los cuales aumentaron las fuerzas para no claudicar.

Finalmente a mi familia, particularmente a mi hijo quién padeció mis ausencias y atención.

Finalmente a Anastasia por su valiosa y enriquecedora compañía.

## INDICE

RESUMEN.....	10
1. INTRODUCCION.....	12
2. ANTECEDENTES.....	14
2.1. Ostricultura en México.....	14
2.2. Generalidades de las especies de estudio .....	15
2.3. Protozooario parásito <i>Perkinsus marinus</i> .....	20
2.3.1. Transmisión y ciclo de vida .....	22
2.3.2. Introducción a México .....	23
2.3.3. Métodos de Diagnóstico .....	26
2.4. Sistema de defensa en moluscos .....	29
2.4.1. Respuesta Inmune.....	29
2.4.1.1. <i>Defensa mediada por hemocitos</i> .....	30
2.4.1.2. <i>Defensa mediada por receptores celulares</i> .....	35
2.4.1.3. <i>Defensa humoral</i> .....	36
2.4.1.4. <i>Proteínas de choque térmico (HSPs)</i> .....	37
2.4.1.5. <i>Inhibidores de serin proteasas involucrados en defensa</i> .....	38
2.4.2. Respuesta antioxidante.....	39
2.4.2.1. <i>Radicales de oxígeno</i> .....	40
2.4.2.2. <i>Radicales de nitrógeno</i> .....	41
2.4.3. Actividad apoptótica.....	43
2.5. Factores de virulencia .....	46
2.5.1. <i>Productos extracelulares (ECP)</i> .....	47
2.5.2. <i>Proteasas de serina</i> .....	48

3	Objetivo general .....	50
3.1	Objetivos particulares.....	50
4	Metodología .....	51
4.1	Infección experimental.....	51
4.2	Validación de la infección.....	57
4.3	Diagnóstico histopatológico.....	60
4.4	Amplificación de genes.....	62
4.5	Expresión génica.....	66
5	Resultados.....	67
4.1	Infección experimental.....	67
5.2	Validación de la infección.....	70
5.3	Diagnóstico histopatológico.....	73
5.4	Amplificación de genes.....	76
5.5	Expresión génica.....	79
6	Discusión.....	88
6.1	Infección experimental.....	88
6.2	Validación de la infección.....	93
6.3	Diagnóstico histopatológico.....	96
6.4	Amplificación de genes.....	97
6.5	Expresión génica.....	101
7	Conclusión.....	108
8	Literatura consultada.....	111
9	Anexos.....	139

## INDICE DE FIGURAS

1. Ciclo de vida de los ostiones.....	17
2. Fotografía externa de ostión de placer y americano.....	18
3. Anatomía interna de los ostiones.....	19
4. Ciclo de vida de <i>P. marinus</i> .....	25
5. Imagen histológica e hiposporas de <i>P. marinus</i> .....	28
6. Representación esquemática de la apoptosis.....	46
7. Cultivo de <i>P. marinus</i> .....	67
8. Sistema experimental.....	68
9. Porcentaje de similitud de las regiones NTS e ITS de <i>P. marinus</i> .....	69
10. Inoculación de <i>P. marinus</i> .....	69
11. Índice de infección y similitud.....	70
12. Diagnostico por PCR.....	72
13. Carga parasitaria (PCR en tiempo real).....	72
14. Diagnóstico histo-patológico.....	74
15. Hibridación <i>in situ</i> .....	75
16. Extracción de ARN.....	76
17. Validación de la retrotranscripción.....	76
18. Evaluación de genes de referencia.....	79
19. Grafico de PCR cuantitativo de los inhibidores de serin proteasa 1....	80
20. Grafico de PCR cuantitativo de los inhibidores de serin proteasa 2...	81
21. Grafico de PCR cuantitativo de Oxido nítrico sintasa .....	82
22. Grafico de PCR cuantitativo de Factor de necrosis tumoral.....	83
23. Grafico de PCR cuantitativo de Proteína de choque térmico 70.....	84

24. Grafico de PCR cuantitativo de Caspasa 3.....	85
25. Grafico de PCR cuantitativo de la proteína inhibidora de la apoptosis..	86
26. Grafico de PCR cuantitativo de superoxido dismutasa.....	87



## INDICE DE TABLAS

1. Índice de infección (Escala de Mackin).....	27
2. Identificación de grupos experimentales.....	55
3. Índice de infección y similitud de regiones NTS e ITS.....	70
4. Diagnóstico histopatológico .....	73
5. Genes relacionados a la respuesta inmune.....	77

## INDICE DE ANEXOS

A. Cultivo de <i>P. marinus</i> .....	139
B. Diagnóstico de <i>P. marinus</i> .....	142
C. Diagnóstico molecular.....	143
D. Histología e hibridación <i>in situ</i> .....	145
E. Protocolos de extracción de ARN, síntesis de cDNA y clonación.....	149
F. Listado de oligos utilizados.....	153

## RESUMEN

*Perkinsus marinus* (Dermo) es un parásito intracelular altamente virulento causante de eventos de mortalidad en poblaciones del ostión americano *Crassostrea virginica* en la costa atlántica de EUA. Durante el 2006 y 2007, *P. marinus* fue reportado por primera vez en ostiones cultivados del estado de Nayarit *Crassostrea corteziensis*. Sin embargo, la presencia del protozoario no promovió eventos de mortalidad masiva como sucedió con la especie *C. virginica* lo que hace suponer que *C. corteziensis* es posiblemente tolerante/resistente a Dermo y la convierte en una especie atractiva para acuicultura. Por lo anterior, la presente propuesta realizó infecciones experimentales inoculando  $1 \times 10^6$  trofozoitos de *P. marinus* en la cavidad de la concha y se colectaron a los días 7 y 14 post-infección. Se estimó la carga parasitaria mediante conteo de hipnosporas (WBBA) y PCR en tiempo real. La confirmación de la infección se realizó mediante diagnostico histológico y molecular en el cual se demostró que del día 0 (control) al día 7 hubo un incremento considerable en el numero de parásitos demostrando que la infección experimental fue exitosa. Adicionalmente se evaluaron genes relacionados a la respuesta inmune, actividad antioxidante y apoptótica los cuales presentaron un patrón de expresión superior en *C. corteziensis* que en *C. virginica* para respuesta inmune y antioxidante, mientras que la actividad apoptótica no presentó diferencias significativas al comparar ambas especies. Los resultados obtenidos sugieren que los mecanismos de defensa de *C. corteziensis* parece ser mas eficientes que *C. virginica* tras infectar experimentalmente con el protozoario patógeno *P. marinus*, lo que podría explicar la ausencia de mortalidades masivas en esta especie del pacifico mexicano. Este trabajo es el primer estudio realizado sobre respuesta inmune en la especie *C. corteziensis* comparado con una especie altamente susceptible, *C. virginica*.

## ABSTRACT

*Perkinsus marinus* (Dermo) is a highly virulent intracellular parasite responsible of mortality events in populations of the American oyster *Crassostrea virginica* along the Atlantic coast of USA. During 2006 and 2007, *P. marinus* was firstly reported in the state of Nayarit in oysters farms where *Crassostrea corteziensis* is culture. However, the presence of Dermo disease not promoted mass mortality events as with the specie *C. virginica* which suggests that *C. corteziensis* is possibly tolerant/resistant to Dermo and makes it an attractive species for aquaculture. Therefore, this proposal made experimental infections by inoculation  $1 \times 10^6$  trophozoites of *P. marinus* in the cavity of the shell and were collected at days 7 and 14 post - infection. Parasite load was estimated by hyphospores counting and real-time PCR. Also histological and molecular diagnosis was done. Results was shown that on day 0 (control ) to day 7 a significant parasite increase was observed, confirming that the experimental infection was successful. Additionally, genes related to immune response, antioxidant and apoptotic activity shown higher expression in *C. corteziensis* than *C. virginica* for immune response and antioxidant activity while apoptotic activity showed no significant differences when both species were comparing. The results suggest that the defense mechanisms of *C. corteziensis* seems to be more efficient than *C. virginica* after challenge with the protozoan pathogen *P. marinus*, which could explain the absence of mass mortalities in this species from Mexican Pacific. This work is the first study on immune response in *C. corteziensis* compared to a highly susceptible species *C. virginica*.

## 1. INTRODUCCION

El cultivo de moluscos bivalvos es una actividad de fácil desarrollo en esteros y costas, impacta poco al ambiente y su consumo posee un alto valor nutritivo. Se producen en el país aproximadamente 45,000 toneladas de las 3 principales especies: 1) *Crassostrea virginica* ú ostión americano en el Golfo de México y 2) *Crassostrea gigas* ú ostión japonés y 3) *C. corteziensis* ú ostión del placer, en el Océano Pacífico (SAGARPA 2013). *Crassostrea corteziensis* es una especie nativa de la costa del pacífico que posee capacidades de adaptación que le permiten tolerar variaciones físico-químicas y enfermedades, entre otras. (Castillo-Duran *et al.*, 2010; Cacéres-Martínez *et al.*, 2010).

Sin embargo, el incremento de la producción y el comercio global entre otros factores favorecen la dispersión de enfermedades que afectan el crecimiento y la supervivencia de los ostiones causando mortalidades masivas (Perkins, 1966). La perkinsosis es uno de los problemas más graves que afectan los cultivos de ostras (Ford y Tripp, 1996). Es causada por el parásito *Perkinsus marinus* descubierto en los años 50's en *Crassostrea virginica*. Se trata de un protozoario intracelular facultativo que es extremadamente virulento y afecta a muchos moluscos de todo el mundo (Burreson y Ragone-Calvo 1996). *Perkinsus marinus* fue reportado en la especie *Crassostrea corteziensis* en granjas ostrícolas del estado de Nayarit pero sin mortalidades importantes registradas (Cacéres-Martínez *et al.*, 2008), por lo que se sugiere que *C. corteziensis* probablemente sea tolerante o resistente al patógeno.

Los moluscos poseen respuesta inmune innata o natural, la cual ocurre a las horas del contacto con el patógeno y carece de especificidad en el reconocimiento del mismo (Medzhitov *et al.*, 1997). Los factores de virulencia del patógeno le permiten establecerse en el ostión. Los moluscos son capaces de localizar a *P. marinus* y fagocitarlo, sin embargo una vez dentro del fagosoma el parasito sobrevive, prolifera y se disemina a través del ostión usando a los hemocitos como vehículos para migrar dentro del hospedero (Asojo *et al.*, 2006). Esto es debido a la baja producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) por parte del molusco y al eficiente sistema de detoxificación de ERO o antioxidación por parte del parasito (Volety y Chu, 1995). Adicionalmente el sistema de defensa de los moluscos utiliza mecanismos para asegurar la homeostasis celular y el correcto funcionamiento del sistema inmune como la apoptosis (Sokolova, 2009).

Por lo anterior, este trabajo presenta evidencia del papel que juegan los mecanismos de defensa de una especie susceptible (*C. virginica*) y una especie potencialmente tolerante/resistente (*C. corteziensis*) infectadas experimentalmente con el protozooario *P. marinus*. Con el propósito de entender la defensa ante el parasito, se evaluaron marcadores moleculares asociados a respuesta inmune, actividad antioxidante y apoptótica, generando información que fortalece los supuestos que indican que *C. corteziensis* posee un mecanismo más eficaz de eliminación de *P. marinus* que *C. virginica*.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Ostricultura en México

El cultivo de moluscos bivalvos, es una actividad que no requiere grandes inversiones para operar y es de fácil desarrollo en esteros y costas. No requiere de infraestructura especializada o alimentación balanceada debido a que los organismos filtran el alimento del mar y tiene bajo impacto para el ambiente. Adicionalmente los moluscos tienen alto valor nutritivo lo cual los hace idóneos para el consumo humano (CONAPESCA 2008). En México la producción de ostión durante 2011 alcanzó alrededor de 45,000 toneladas de las cuales el 93% se generaron por acuicultura. La ostricultura en el Golfo de México aporta el 84% de la producción nacional, siendo Veracruz y Tabasco los estados que más aportan con aproximadamente 38,000 toneladas de peso fresco de ostión americano *Crassostrea virginica* ú ostión del Este. En el Pacífico, los estados del noroeste aportan 6,000 toneladas correspondientes al 10% de la producción nacional. Nayarit es fue el estado de mayor producción de ostión de placer *C. corteziensis* (1500 toneladas) durante el 2012 (Datos según el Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2013. CONAPESCA, 2013).

Por más de 4 décadas el ostión japonés (introducido en el noroeste de México en 1970) se ha cultivado en los Estados de Sinaloa, Sonora, Baja California Sur y Baja California. Sin embargo, en los últimos 10 años el ostión de placer ha mantenido un crecimiento sostenido en los Estados de Nayarit (principalmente); Sinaloa y Baja California Sur (Chavez-Villalba *et al.* 2005). Desde entonces, se han desarrollado

estudios con el propósito de producir larvas, conocer las condiciones ideales de cultivo y sus patologías, entre otros trabajos, a fin de acrecentar la actividad acuícola de la especie. Con este objetivo Mazón-Suasteguí y colaboradores (2011), desarrollaron estrategias para la producción de semillas de ostión del placer las cuales fueron empleadas para cultivo. Por otra parte, Castillo-Duran (2010) demostró que *C. corteziensis* posee la capacidad de adaptar sus funciones metabólicas a las variaciones de temperatura sin cambios en su crecimiento durante temporadas extremas. Enriquez-Ocaña *et al.*, (2012) considera que *C. corteziensis* posee plasticidad para las condiciones que prevalecen en el noroeste de México debido a que es una especie nativa y esta perfectamente adaptada a las variaciones estacionales de la región. Una importante aportación es mencionada Cáceres-Martínez en 2008 y 2010, quién enlista a los patógenos asociados a cultivos de ostión del placer en el Estado de Nayarit.

La especie *C. corteziensis* es nativa del pacífico mexicano, posee importancia económica y características fisiológicas que la convierten en una especie valiosa para la ostricultura regional, no solo por su demanda sino por su tolerancia a diversos patógenos y condiciones fisicoquímicas adversas (Mazón-Suasteguí *et al.*, 2011).

## 2.2 Generalidades de las especies de estudio.

El ostión del Este pertenece al grupo de moluscos económicamente más importante de los Estados Unidos de América (EUA), con una producción aproximada en 2012 a las 135,000 toneladas (FAO Fishstat, 2012). Se distribuye a lo largo del océano atlántico desde el Golfo de San Lorenzo en Canadá hasta la Laguna de Términos Campeche, México. Gusta de zonas arrecifales, fondos firmes y duros de la zona intermareal y submareal (Kennedy *et al.*, 1996). Es un organismos altamente tolerante a fluctuaciones térmicas (15°C a 42°C) siendo su temperatura óptima de 20 a 30°C (Stanley y Sellers, 1986) y salinidad (0 a 42 ppm) de 14 a 28 ppm (Quast *et al.*, 1988; Shumway, 1996).

Esta especie es protandrica, es decir que desarrolla ambos sexos. Su primera madurez es como machos y cambian de sexo anualmente en respuesta al ambiente, alimentación y/o estrés fisiológico (Ford *et al.*, 1990; Thompson *et al.*, 1996). Aunque su fecundidad es difícil de estimar, se ha establecido un rango entre 2 y 115 millones de huevos al año, número que varía de acuerdo a su tamaño y ubicación geográfica (Buroker, 1983). Los gametos son depositados en la columna de agua en respuesta a una variedad de estímulos como: temperatura, salinidad, alimentación, etc. Los huevos fertilizados se desarrollan como larvas trocóforas las cuales dependen de reservas internas como suministro de energía. Después de 24 horas, las trocóforas se convierten en larvas véliger con concha y usan un órgano ciliado (velum) para capturar alimento y para nadar. Dos semanas después, dependiendo de la abundancia de alimento y temperatura, la larva véliger desarrolla una mancha





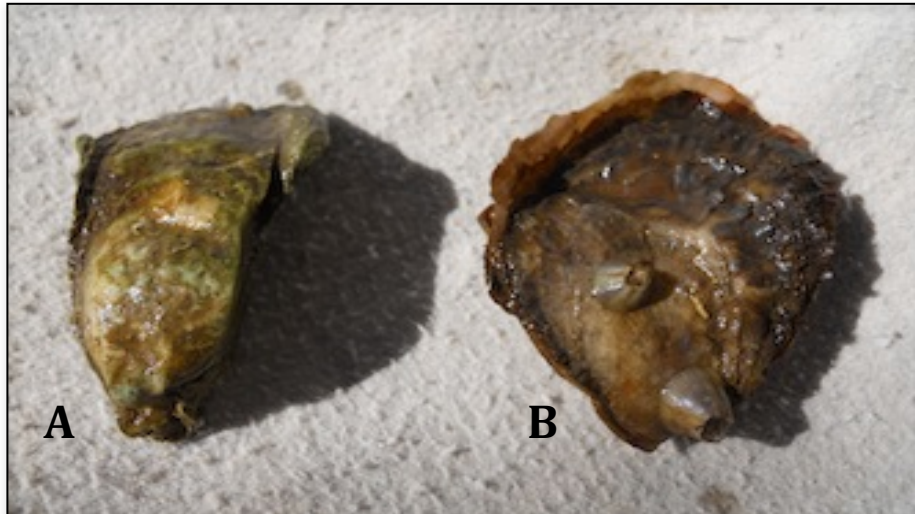


Figura 2. Fotografía de los ostiones, A: *Crassostrea virginica*.  
B: *Crassostrea corteziensis*. Ambos de longitud promedio de 72 mm

Estos mismos autores describieron factores ecológicos y biológicos en las poblaciones de *C. corteziensis* del estado de Nayarit, en los cuales se hace especial énfasis en las variaciones hidrológicas y el efecto sobre la reproducción de esta especie, ya que al parecer la variación de temperatura a lo largo del año y la baja salinidad alteran el ciclo gonádico y el desove. Las temperaturas ideales de cultivo de esta especie van desde 22.4°C hasta 32.2°C. Altas temperaturas favorecen el crecimiento a razón de 0.528 mm/día, mientras que bajas temperaturas como por ejemplo a 22°C la velocidad de crecimiento disminuye a 0.235mm/día. El ostión del placer alcanza su talla comercial a los 13 meses mientras que el ostión americano requiere de 3 años (Stuardo y Martínez, 1975; Mazón-Suasteguí *et al.*, 2011; Chavéz-Villalba *et al.*, 2005).

Internamente el ostión está cubierto por un manto conformado por tejido conectivo, vasos sanguíneos, fibras musculares y nervios, el cual se encuentra unido a las

valvas y es el responsable de la formación de la concha y del ligamento que las mantiene unidas. El músculo abductor que se halla unido a las valvas, actúa en contra de la presión ejercida por el ligamento. El sistema digestivo está formado por boca, esófago, estómago, glándula digestiva, intestino, recto y ano. Las branquias se extienden desde la boca hasta la proximidad del ano y tienen doble función, al encargarse de la alimentación y del intercambio gaseoso en el proceso de respiración (Eble y Scro, 1996). El sistema circulatorio de los ostiones es abierto y está constituido por la hemolinfa, la cual es bombeada por el corazón. Los hemocitos (células circundantes en la hemolinfa), tienen la función de ser los mecanismos de defensa celular (Wallace, 2001). La anatomía interna de los ostiones se muestra en la figura 3. Los ostiones son machos funcionales durante su primer desove, mientras que solo la mitad de ellos permanecen como machos para su segundo desove (Barnes, 1986).

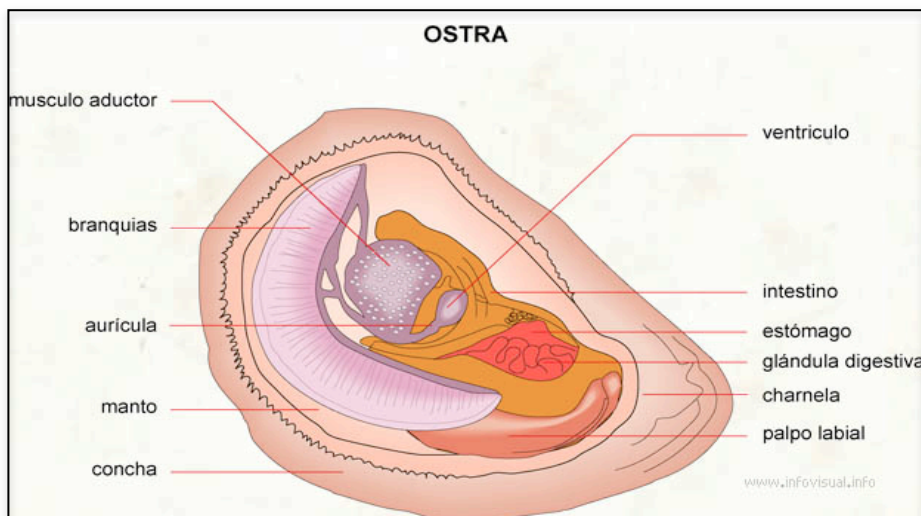


Figura 3. Esquematización de la anatomía interna de los ostiones y anotación de sus principales órganos. Tomada de: [www.infovisual.info/02/009\\_es.html](http://www.infovisual.info/02/009_es.html)

### **2.3 Protozooario parásito *Perkinsus marinus***

Este protozooario fue inicialmente clasificado como un hongo dentro del género *Dermocystidium* (*D. Marinum*) de acuerdo a Mackin y colaboradores en 1950. Años después, estudios de ultraestructura durante el estadio de zoospora revelaron características morfológicas parecidas a los parásitos del filo Apicomplexa, lo cual permitió la creación de un nuevo género llamado *Perkinsus* dentro de este filo, renombrando a *D. Marinum* como *P. marinus* (Levine, 1978). Tiempo después las evidencias generadas mediante estudios de filogenia molecular cuestionan la inclusión de las especies de *Perkinsus* dentro del filo Apicomplexa (Siddall *et al.*, 1997). Después se demostró que *P. marinus* tiene afinidades taxonómicas con el género *Parvilucifera*, un protista que parasita dinoflagelados (Noren *et al.* 1999). Fue entonces que se establecía el nuevo filo Perkinsoza como grupo hermano de Apicomplexa que incluye el género *Perkinsus*, *Parvilucifera* y *Cryptophagus* (Brugerolle, 2002; Norén *et al.*, 1999). La llegada de herramientas moleculares permitió implementar el uso de marcadores para estudios filogenéticos empleando a beta actina, tubulina, proteínas de choque térmico 90 y el gen de la subunidad pequeña del ácido nucleico ribosomal (SSU rRNA). Se considera que el filo Perkinsoza fue el grupo que divergió más temprano del linaje de dinoflagelados (Kuvardina *et al.*, 2002; Leander y Keeling 2004; Saldarriaga *et al.*, 2003). El parásito *Perkinsus marinus* pertenece al Orden Perkinsida, Clase Perkinsea, del Filum Apicomplexa (Perkins, 1976; Levine, 1978). Se clasificó así como resultado de las observaciones ultraestructurales de *Perkinsus* en las que se encontró la presencia de un complejo apical, una membrana subpelicular y la formación de microsporas y zoosporas, características similares a otros miembros pertenecientes

al grupo de los Apicomplexa. Sin embargo hay una diferencia, las zoosporas de *Perkinsus* muestran un flagelo y una vacuola anterior, característica que no se presenta en los Apicomplexa (Levine, 1978).

*P. marinus* se distribuye a lo largo de la costa atlántica de Norteamérica, desde la bahía de Chesapeake en Maryland - Estados Unidos hasta el Golfo de México en Tabasco (Burreson *et al.*, 1994; Ford, 1996; Soniat, 1996). Las especies de *Perkinsus* están asociados a enfermedades de moluscos bivalvos. *P. marinus* fue la primera especie descrita de este grupo y ha sido asociada a mortalidades masivas en el ostión del Este *C. virginica* (Burreson *et al.*, 1994). Seis nuevas especies se han descubierto: 1.) *P. Olseni* del abulón australiano *Haliotis ruber* (Lester y Davis, 1981) y de la almeja europea *Ruditapes decussatus* (Azevedo, 1989), 2) *P. qugwadi* de la escalopa japonesa, *Patinopecten yessoensis* (Blackbourn *et al.*, 1998). 3) *P. chesapeaki* de la almeja de cocha blanda *Mya arenaria* (McLaughlin *et al.*, 2000). *P. andrewsi* de la almeja del Baltico *Macoma balthica* (Coss *et al.*, 2001). *P. mediterraneus* del ostión plano *Ostrea edulis* (Casas *et al.*, 2004) y *P. honshuensis* del calamar manila japonés *Venerupis philippinarum* (Dungan y Reece, 2006). Las especies designadas como *P. chesapeaki*, *P. mediterraneus*, y *P. honshuensis* se clasificaron en base a su morfología, tipo de hospedero y localización, respaldado por análisis de secuencias del gene rRNA y el espaciador transcribible interno (ITS) (Casas *et al.*, 2004, Dungan y Reece 2006, McLaughlin *et al.*, 2000). Por otro lado, *P. olseni* y *P. atlanticus* se consideraron especies distintas basadas en su localización geográfica (Azevedo, 1989; Lester y Davis, 1981). Estudios posteriores donde se obtuvieron resultados mediante la

comparación de las secuencias ITS del ADN que codifica para el ARN ribosómico de estas especies, muestran que *P. atlanticus* y *P. olseni* constituyen una única especie la cual difiere de *P. marinus* (Goggin, 1994). La designación de las especies *P. andrewsi* se basó en regiones de ARNr y secuencias intergenicas obtenidas de cultivos clonales. Sin embargo, el análisis morfológico de estas protozoos aislados no presentaron suficiente evidencia para sostener su designación. (Coss et al., 2001).

### 2.3.1 Transmisión y ciclo de vida

La transmisión de *Perkinsus sp* ocurre directamente, sin hospederos intermediarios (Chu, 1996; Blackbourn *et al.*, 1998) o bien a través de los trofozoitos que son liberados por bivalvos moribundos al ambiente, los cuales son filtrados por moluscos vecinos (Andrews, 1996). El desarrollo de *P. marinus* inicia como trofozoito inmaduro de estructura esférica la cual forma una vacuola que da como resultado una forma de anillo (vacuoplasto). Esta estructura una vez ingerida por el ostión, es fagocitada por los hemocitos localizados en el epitelio del intestino (Mackin, 1951; Perkins, 1976), manto y branquias (Allam y Ford, 2002). *P. marinus* fagocitado reside en una estructura de fagosoma donde prolifera por fisión múltiple y/o gemación. Durante esta fase se realizan divisiones binarias sucesivas, en el cual se obtienen de 8 a 16 células hijas (Figura 4). Cada célula hija es llamada trofozoito inmaduro y permanecen unidas dentro de una pared llamada tomonte (Villalba *et al.*, 2004). Posteriormente, la pared del tomonte (trofozoito multinucleado) se rompe para liberar a los trofozoitos que se desarrollan hasta convertirse en trofozoitos maduros (Goggin y Lester, 1995; Blackbourn *et al.*,

1998). Estas estructuras son liberadas del hospedero a través de las heces (Bushek *et al.*, 2002) o por muerte del animal (Ragone-Calvo *et al.*, 2003), entonces están en condiciones de infectar a otro ostión. Perkinsus posee una etapa libre (sin hospedero) en la cual incrementa su tamaño y pierde el vacuoplasto, una nueva estructura se desarrolla en forma de pared llamada Hipnospora (etapa visible cuando se usa Medio de Tioglicolato RFTM). Posteriormente la hipnospora empieza a dividirse por ciclos de cariocinesis y citocinesis, aunque es sabido que se mantiene inactiva por largos periodos de tiempo (Casas *et al.*, 2002). La hipnospora desarrolla un poro con un tubo de descarga, mientras se produce la palintomia para formar numerosas zoosporas y se estima que se producen alrededor de 1000 a 2000 por cada hipnospora (Perkins, 1976). Las zoosporas son liberadas al ambiente cuando el poro de descarga se abre. Los parásitos liberados en la columna de agua maduran como trofozoitos y forman prezoosporas las cuales producen una gran cantidad de zoosporas biflageladas (Perkins, 1996) (Figura 4). Las zoosporas son móviles y están en condiciones de infectar de nuevo mediante un mecanismo aun no conocido (Andrews 1996). La dinámica de la transmisión inicia, cuando la temperatura es superior a los 20°C y a salinidad mayor a 15 ppm para el ostión, siendo estos factores los que contribuyen a las epizootias que favorecen la aparición de brotes en los meses cálidos (Andrews, 1988; Burreson y Ragone-Calvo, 1996).

### 2.3.2 Presencia en México

Burreson y colaboradores (1994) reportaron por primera vez la presencia de *P. marinus* en 1994 en el estado de Tabasco donde se cultiva *C. virginica*, mientras que Cáceres-Martínez (2008) realizó el primer registro del parásito en lagunas

costeras del Estado de Nayarit. Posteriormente se encontraron organismos positivos en el estado de Sonora (Enríquez-Espinosa *et al.*, 2010) y en las costas de Sinaloa (Cáceres-Martínez *et al.*, 2012). De acuerdo a Parra-Laca (2010), el ingreso de *P. marinus* a la costa oeste de México se debió al movimiento ilegal de *C. virginica* en el año 2005 procedente de Luisiana EUA, con el propósito de evitar la pérdida total de la producción de aquel estado, enviaron a Sonora reservas de ejemplares que habían sobrevivido al huracán Katrina. Parra-Laca menciona en su tesis que existe una introducción previa alrededor de los años 80's, donde se comercializaron ejemplares de *C. virginica* provenientes de la Laguna de Tamiahua del Estado de Veracruz hacia Boca de Camichín en el Estado de Nayarit.

Sin embargo, sugiere que este tipo de movilizaciones son comunes entre comerciantes y que aparentemente han ocurrido a lo largo del tiempo (Cáceres-Martínez *et al.*, 2008). Hoy en día, *P. marinus* parasita ostiones cultivados y silvestres de los estados de Sonora, Sinaloa, Baja California Sur y Nayarit (Escobedo-Fregoso *et al.*, 2013; Cáceres-Martínez *et al.*, 2012; Cáceres-Martínez *et al.*, 2010; Enríquez-Espinosa *et al.*, 2010; Cáceres-Martínez *et al.*, 2008)



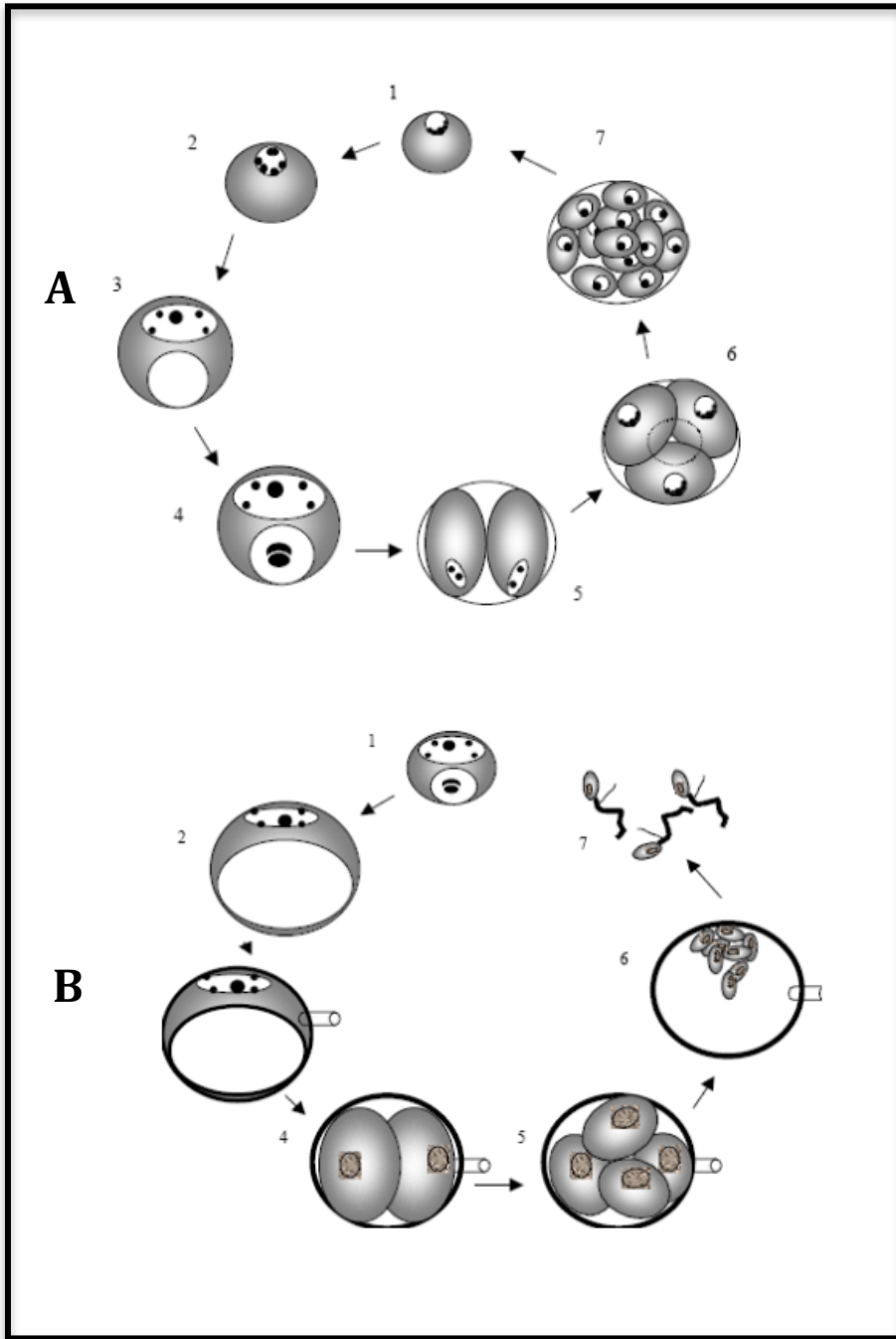


Figura 4. A: Ciclo de vida de *Perkinsus marinus* basado en el modelo de infección del ostión americano *Crassostrea virginica*. 1-2. Trofozoito inmaduro, 3. Trofozoito desarrollando su vacuola, 4. Trofozoito maduro. 5 al 7 trofozoito en palintomia (división interna). B: Ciclo de vida libre de *Perkinsus marinus*. 1. Trofozoito libre. 2. Trofozoito sin vacuoplasto. 3. Trofozoito con el tubo de descarga. 4-6 Trofozoito en palintomia o esporulación. 7. esporas libres. Tomado de Navarro, 2011. De: Cáceres Martínez, 2002.

### 2.3.3 Métodos de Diagnóstico

Muchos métodos han sido utilizados para el diagnóstico de *Perkinsus marinus* los cuales incluyen detección directa, histología-microscopia electrónica (Figura 5) (Mackin, 1951; Bower *et al.*, 1998), Medio fluido de Tioglicolato (FTM) (Ray, 1953; Ford *et al.*, 1999), inmunología (Romestand *et al.*, 2001) y Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Dungan y Reece, 2006; Moss *et al.*, 2008).

Desde su primer uso en *P. marinus* el diagnóstico, en medio tioglicolato desarrollado por Ray en 1953, llamado comúnmente como ensayo FTM de Ray (FTMR), se convirtió en el método más utilizado para el estudio y diagnóstico de *Perkinsus*. El método consiste en la incubación en medio FTMR por dos semanas en el cual el parásito se alarga (Hipnospora), posteriormente se tiñe con lugol y se cuantifican las hipnosporas (Ray, 1966). El número total de hipnosporas permite estimar el nivel de infección mediante la escala de intensidad de infección descrita por Mackin en 1962, quien estableció 5 categorías siendo 0 no infectado y 5 severamente infectado. Craig y colaboradores en 1989, modificaron las categorías propuestas por Mackin subdividiendo los niveles de infección (Ver Tabla 1). La técnica ha sido exitosamente utilizada para determinar infecciones en ostiones y almejas en las especies *C. virginica* y *C. corteziensis* (Burreson *et al.*, 1994; Cacéres-Martínez *et al.*, 2008).

<b>Intensidad</b>	<b>Valor numérico</b>	<b>Descripción</b>
Negativo	0.00	Sin hipnosporas
Muy ligero	0.33 a 1-10	Hipnosporas
Ligero -	0.67 a 11-74	Hipnosporas
Ligero	1.00 a 75-125	Hipnosporas
Ligero +	1.33 > 125	Hipnosporas
Ligero/moderado -	1.67	< 25% del tejido
Ligero/moderado	2.00	25% del tejido
Ligero/moderado +	+ 2.33	>125 mucho menos <50%
Moderado -	2.67	>25% pero <50%
Moderado	3.00	50% del tejido
Moderado +	3.33	>50% pero mucho <75%
Moderadamente	-3.67	>50% pero <75%
Moderadamente fuerte	4.00	75% del tejido
Moderadamente fuerte +	4.33	>75% pero menos que 100%
Fuerte	4.67	>75% pero el tejido visible
Fuerte +	5.00	100%

Tabla 1. Índice de infección (Escala de Mackin). Categorías de infección por *P. marinus* propuesto por Mackin en 1962 y modificada por Craig en 1989. El índice es obtenido mediante conteo de hipnosporas observadas en el tejido incubado en medio RFTM dividido por el peso del tejido evaluado (Log 10).

Otros métodos permiten cuantificar la carga parasitaria total mediante la incubación en RFTM y posterior digestión de los organismos completos (Whole Body Burden Assay o WBBA). Este método permite estimar el número de hipnosporas de *Perkinsus* por gramo de peso fresco del organismo (Park *et al.*, 1999; Park y Choi, 2001). El método ha demostrado ser sensible para detectar pocas células en almejas y ostiones (Park y Choi 2001; Rodríguez y Navas, 1995). La sensibilidad es alta, especialmente para el análisis de la carga parasitaria total (Figura 5). Choi y colaboradores (2002) encontraron que hay una fuerte correlación (carga parasitaria) entre el número total de células del protozooario en almejas completas y con respecto a las branquias por lo que sugiere que se incluya solo a las branquias en el diagnóstico de rutina. Pese a que FTMR no distingue entre especies de *Perkinsus* y que su reproducibilidad es baja, esta técnica es considerada el estándar de oro en materia de diagnóstico de *P. marinus* (Choi *et al.*, 2002; Yarnal *et al.*, 2000).

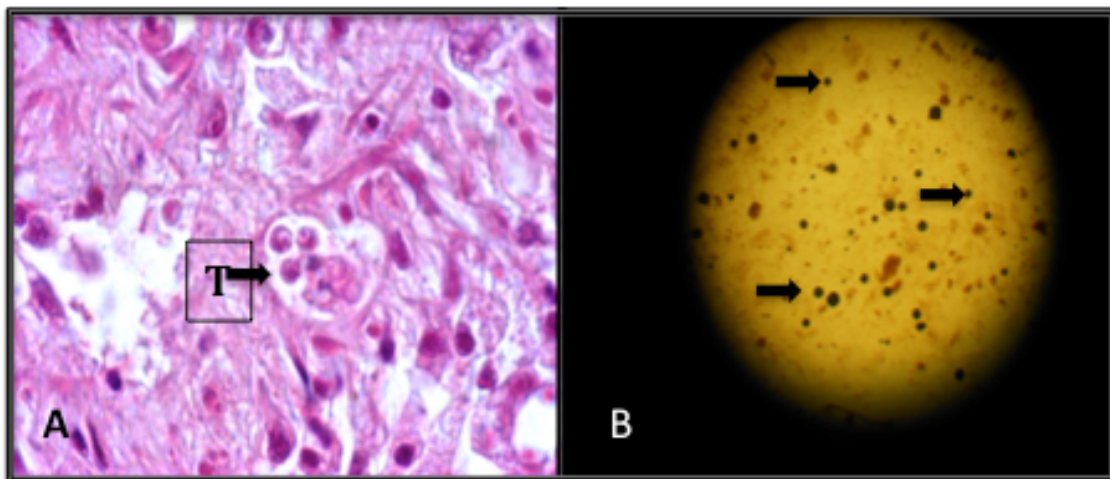


Figura 5. *Perkinsus marinus*. A: Tomonte, trofozoito en división (palintomía). Tejido teñido con H&E. B. Conteo de hipnosporas mediante la técnica de carga parasitaria del organismo completo (WBBA).

De acuerdo al Manual de Diagnostico de la OIE (2006), la técnica de PCR es utilizada exitosamente como una prueba diagnóstica confirmatoria del diagnostico basado en RFTM. Marsh y colaboradores (1995) desarrollaron un método semicuantitativo amplificando marcadores nucleares NTS en el cual a partir de 1µg de ADN de ostiones infectados se podía detectar hasta 10 pg de *P. marinus*. Este resultado fue corroborado por medio de autoradiografía de la hibridación en membrana del ADN (Southern blot). Más tarde Robledo y colaboradores en 1998 realizaron ensayos basados en PCR para establecer métodos de diagnósticos especie-especifico utilizando la región ITS sobre las especies *Perkinsus marinus* y *Perkinsus olseni*, con una sensibilidad de 1 célula del protozooario por cada 30 mg de tejido. Yarnall y su equipo de trabajo (2000) desarrollaron un sistema de detección de secuencias (PCR en tiempo real o RT-PCR) para cuantificar células del protozooario y correlacionar el resultado con conteos del mismo mediante FTMR encontrando diferencias mínimas entre ambos métodos pero demostrando que por RT-PCR era posible detectar hasta 3 parásitos mientras que FTMR carecía de esta sensibilidad. Otros métodos diagnósticos basados en técnicas inmunológicas fueron establecidos siendo el más utilizado el protocolo desarrollado por Romestand (2001) siendo el primer método directo basado en el Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas o ELISA utilizando anticuerpos monoclonales para *P. marinus* con el propósito de evaluar la generación de trofozoitos durante su multiplicación en medio de cultivo llamado JLODRP1.

## 2.4 Sistema de defensa en moluscos

### 2.4.1 Respuesta Inmune

La respuesta inmune puede dividirse en inmunidad innata o natural e inmunidad adaptativa o adquirida. En ostiones aplica la primera, la cual ocurre a las pocas horas después del contacto con el patógeno; es el sistema de vigilancia que detecta la presencia y naturaleza de la infección y constituye la primera línea de defensa del hospedador contra un agente patógeno (Medzhitov, 2001). Este sistema esta ausente de capacidad de distinción entre distintos agentes extraños aunque es capaz de reconocer estructuras patrón asociadas a patógenos conocidas como Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs) que están presentes en la superficie de diferentes microorganismos (Medzhitov y Janeway, 1997). La carencia de especificidad en el reconocimiento, hace que la respuesta sea exactamente igual cada vez que ocurre el contacto con la partícula extraña. Roberts y colaboradores (2012) evaluaron la expresión de genes relacionados a respuesta inmune en ostiones infectados con *P. marinus* y estresados mecánicamente encontrando alteraciones histológicas e incremento de la expresión de inductores de apoptosis.

#### 2.4.1.1 Defensa mediada por hemocitos

Hemolinfa y hemocitos: El sistema inmune innato en todos los animales establece dos elementos de defensa: humorales y celulares. En el ostión, los mecanismos de defensa humorales se lleva a cabo mediante proteínas que están disueltas en la hemolinfa mientras que el componente de la inmunidad celular está mediado por los hemocitos (Feng, 1988; Roberts et al., 2012). Es bien sabido que las respuestas defensivas de los invertebrados adolecen de especificidad y memoria. La hemolinfa

es una inmunoglobulina, proteína humoral inicialmente descrita en insectos con un peso molecular de 48 kDa, sintetizada por los cuerpos grasos y hemocitos como consecuencia de una infección bacteriana y está involucrada en respuestas defensivas de invertebrados (Kanost. 1999).

En 1968 Farley designó “hemocitos” a las células sanguíneas de los moluscos bivalvos. El sistema circulatorio es abierto, los hemocitos pueden estar implicados en una amplia variedad de procesos fisiológicos, por mencionar algunos: mecanismos de digestión o de excreción, de transporte y reparación de la concha mineralización de la concha entre otras funciones (Cheng, 1981). Sin embargo, el principal rol de estas células es la defensa contra agentes patógenos (Hégaret *et al.*, 2007; Roberts *et al.*, 2012). Los hemocitos se han clasificado de acuerdo a su función, morfología y citoquímica (Hine 1999), para ello se han utilizado diferentes técnicas tanto de microscopía de luz, como electrónica de transmisión y de barrido (Chang *et al.* 2005, Sun *et al.* 2006), así como por citometría de flujo (Allam *et al.* 2002; Wang *et al.* 2012)

En bivalvos marinos existen al menos tres tipos principales de hemocitos: los granulocitos, los hialinocitos, y los blastocitos o células indiferenciadas (Cheng 1981; Wooton *et al.*, 2003; Donaghy *et al.*, 2009). Los granulocitos se clasifican en relación a las características de sus gránulos en basófilos y acidófilos, mientras (Donaghy *et al.*, 2009) que los hialinocitos se caracterizan por tener poco o nulo contenido en gránulos. Los hemocitos de moluscos bivalvos tienen capacidad de fagocitosis y se sabe que los granulocitos son más activos y por tanto tienen mayor capacidad de fagocitosis que los hialinocitos (Cheng 1981).

Inflamación: La inflamación es un proceso que evidencia la presencia de agentes patógenos en el organismo hospedero. Perkinsus provoca infiltración hemocítica e inflamación justo alrededor de áreas infectadas (Choi and Park, 2010). Durante la inflamación intervienen tanto componentes humorales como celulares. Este mecanismo se define como el reclutamiento hemocitario y la salida de proteínas plasmáticas (extravasación) hacia el lugar de la infección (Abbas y Lichtman, 2000). La respuesta inflamatoria es activada por macrófagos que a su vez producen citosinas tales como Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) e interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), entre otros (Korhonen *et al.*, 2005).

Este proceso empieza tras la entrada del parásito y puede eventualmente terminar con la destrucción del tejido dañado, aislamiento y destrucción del organismo invasor o la completa reparación del tejido (Feng, 1988). Para que la inflamación ocurra, el patógeno debe ingresar a través de las valvas mediante la filtración o bien atravesando la principal barrera de defensa es decir la concha. La concha y el mucus poseen enzimas con actividad bactericida (Glinski y Jarosz, 1997). Desriac y colaboradores (2010) describieron actividad bactericida del mucus de ostión mediante la caracterización de péptidos antibióticos. Una vez superadas estas barreras física (concha) y química (mucus) los componentes celulares y humorales son los responsables de la eliminación del agente exógeno. Los hemocitos juegan un papel importante en la reparación tisular, descritas en seis etapas: 1. migración de hemocitos al sitio de la herida. 2. Agregación hemocitaria o tapón. 3. Reemplazo de tejido dañado. 4. Deposición de colágeno mediante fibroblastos. 5. Fagocitosis de restos celulares y, 6. Reestructuración tisular (Sparks y Morado, 1988).



Fagocitosis: es un proceso conservado a lo largo de la evolución que se da de manera universal en todo el reino animal desde protozoos hasta animales superiores (Feng, 1988). Este proceso puede dividirse en cinco etapas que consiste: Reconocimiento de la partícula no propia, adhesión, ingestión, destrucción y eliminación. Los mecanismos por los cuales los hemocitos encuentran partículas no propias están mediados por pequeñas moléculas de naturaleza peptídica liberadas por los organismos patógenos o bien por componentes de la pared celular tales como Lipopolisacaridos (LPS), proteasas, etc (Cerenius y Soderhall, 2013). El reconocimiento de las partículas extrañas se produce a través de los hemocitos (probablemente receptores celulares) y diversos PAMPs (Feng, 1988). En el proceso de adhesión las proteínas presentes en el suero como las aglutininas, median la unión del agente extraño a los posibles receptores presentes en la superficie celular de los hemocitos. Sin embargo, no son los únicos factores humorales descritos en invertebrados que pueden llevar a cabo esta función (Ratcliffe *et al.*, 1985). Posteriormente se inicia la ingestión de las partículas extrañas por parte de los hemocitos. Estos procesos de adhesión e ingestión se realiza de diferentes formas; normalmente los hemocitos emiten pseudópodos englobando y atrapando a los microorganismos (Ratcliffe *et al.*, 1985) o bien, se producen invaginaciones de la membrana plasmática para la internalización de las partículas (López *et al.*, 1997). La inhibición de la polimerización de la actina reveló que el citoesqueleto juega un papel primordial en los procesos de internalización (Cheng y Howland, 1982).

Los procesos fagocíticos como la digestión y destrucción del patógeno independientemente del mecanismo de internalización utilizado, produce vacuolas fagocíticas conocidas como fagosomas que interaccionan con los lisosomas presentes en los hemocitos (Fisher, 1986). Al interior del lisosoma las enzimas hidrolíticas ácidas atacan a las vacuolas recién formadas destruyendo al agente patógeno (Ratcliffe *et al.*, 1985; López *et al.*, 1997). Tras la destrucción intracelular de un patógeno se forman gránulos de glucógeno que son utilizados en procesos metabólicos del hemocito o bien se liberan al suero (Fisher, 1986). La liberación de estas moléculas determina procesos de degranulación, donde la lisozima y otros productos acumulados en gránulos del citoplasma se liberan al medio mediante procesos de exocitosis (Fisher, 1986).

Agregación: también conocida como formación de nódulos, es un mecanismo asociado a la fagocitosis y consiste en la formación de agregados o grumos sobre las heridas (Ratcliffe *et al.*, 1985). Los hemocitos, junto con otras células no fagocíticas se acortan para formar una maraña tisular donde quedan atrapadas las partículas no propias. La agregación hemocítica concluye con la eliminación del patógeno y el posterior depósito de melanina (Ratcliffe *et al.*, 1985; Sideri *et al.*, 2007).

Encapsulación: La encapsulación permite la inmovilización de partículas de tamaño superior al de los hemocitos, esta respuesta comprende la formación de capas concéntricas, formadas por hemocitos. La formación de cápsulas de origen hemocitario frente a protozoos parásitos ha sido estudiada en detalle en la ostra *C.*

*virginica* (Cheng, 1996), las almejas *Tapes semidecussatus* (Montes *et al.*, 1995) y en *Mercenaria mercenaria* (Smolowitz *et al.*, 1998). La encapsulación de parásitos es observada frecuentemente en cortes histológicos de moluscos infectados por *Perkinsus* (Casas 2002; Choi *et al.*, 2002), el sitio infectado presenta granulocitos secretores de polipeptidos glicosilados de un peso molecular de 225 kDa (p225), los cuales se almacenan en la membrana de los granulocitos y se liberan en forma de capsula alrededor de los trofozoitos de *Perkinsus* (Montes *et al.*, 1995). El polipéptido p225 constituye el principal componente de las capsulas que inmovilizan al parásito y se ha demostrado que no se encuentra presente en moluscos libres de *Perkinsus* (Montes *et al.*, 1996).

#### 2.4.1.2 Defensa mediada por receptores celulares

*Receptores Toll-like (TLRs)*: El reconocimiento de los patógenos por las células de la respuesta inmune innata está dada por un grupo de receptores conocidos como receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PRRs). Dentro de este grupo se incluyen los receptores tipo Toll o TLRs, los cuales son capaces de detectar patrones moleculares de microorganismos patógenos a los que se les denomina patrones moleculares asociados a patógenos o PAMPs los cuales son esenciales para la supervivencia y patogenicidad del microorganismo. Poseen una tasa muy baja de mutación por ende conservadas y capaces de inducir una fuerte respuesta del sistema inmune innato (Takeuchi y Akira, 2010).

Los TLRs son moléculas transmembranales que poseen un dominio extracelular con motivos ricos en repeticiones de leucina (LRR), un dominio transmembrana

(TM) y un dominio intracelular conocido como receptor Toll / IL-1 (TIR) (Abbas y Lichtman, 2000). La unión de un determinado ligando al motivo LRR desencadena una cascada de transducción de señales que activa a factores de transcripción de genes implicados en respuesta inmune (Takeda y Akira, 2004). En moluscos bivalvos, se han identificado varias ESTs con homología a TLR en *C. gigas* (Tanguy *et al.*, 2004), *Argopencten irradians* (Song *et al.*, 2006) y de Alaska, *Chlamys farreri*, en la cual se ha llevado a cabo la caracterización molecular completa de un receptor con homología al Toll de *Drosophila* y denominado CfToll-1 cuya expresión se ve modulada por Lipopolisacaridos (LPS) (Qiu *et al.*, 2007)

#### *2.4.1.3 Defensa humoral*

Los invertebrados carecen de inmunoglobulinas, sin embargo poseen numerosos factores humorales involucrados (naturales e inducibles) en reacciones defensivas de naturaleza inespecífica (Rinkevich y Müller, 1996). Las lisozimas, lectinas, aglutininas, el sistema de activación de la fenoloxidasa, bacticidinas y factores de inmovilización actúan como moléculas de reconocimiento, ya sea incrementando o modulando la reactividad de los efectores celulares circulantes (Rinkevich y Müller, 1996).

Lisozimas: son enzimas con capacidad antibacteriana aunque también se les ha conferido actividad antifúngica y antiprotozoaria. La lisozima se almacena en el interior de los lisosomas de los hemocitos (Mohandas *et al.*, 1985) y su liberación al medio extracelular se estimula por los procesos de fagocitosis (Cheng *et al.*, 1975).

El mecanismo de liberación al medio es mediante un proceso conocido como degranulación (Cheng *et al.*, 1975). Aunque está involucrada en procesos de fagocitosis, el principal papel de la lisozima es la digestión ya que las bacterias son parte de la dieta de los moluscos bivalvos (Cheng, 1983). Se distribuye en todos los órganos de los moluscos. El papel de las lisozimas sobre *P. marinus* es controversial, pues por un lado Chu y colaboradores (1989) reportaron una correlación entre la concentración de lisozimas con respecto al protozoario, es decir mas lisozima esta presente cuando hay mayor cantidad de parasitos. Sin embargo La Peyre (1995) encontró que la disminución de lisozima si favorece positivamente a la carga parasitaria.

*Lectinas/aglutininas*: son proteínas ubicuas consideradas como uno de los principales factores defensivos en moluscos e implicadas en: 1) el reconocimiento de partículas exógenas, 2) inflamación, interacción célula-célula, fertilización y regeneración (Ahmed y Vasta, 1996). Las lectinas participan en la opsonización de bacterias, hongos y protozoarios proporcionando un vínculo entre los mecanismos de defensa humoral y celular (Bayne, 1990). Kim y colaboradores (2006) encontraron que *P. marinus* induce la expresión de lectinas de la almeja *Ruditapes philippinarum* después de infectar experimentalmente hemocitos.

#### 2.4.1.4 Proteínas de choque térmico (HSPs) y su papel en la defensa

La exposición de las células a una variedad de microorganismos y el incremento de la temperatura induce la síntesis de proteínas denominadas proteínas de choque térmico. El mecanismo de las HSPs provee protección a las células y tejidos ante

condiciones de estrés tanto por temperatura como por patógenos (Encomio y Chu, 2007). Actúan como chaperones moleculares facilitando el apropiado desdoblamiento, ensamble y transporte intracelular de proteínas. La HSP de 70kDa es la proteína más común en respuesta a estrés (Lindquist, 1986). Su actividad ayuda a proteger a los organismos de los daños inducidos por estrés térmico (Encomio y Chu, 2007). Gracias a su papel, los moluscos mejoran su capacidad de tolerancia a ambientes de adversos y como consecuencia garantiza su sobrevivencia pues se ha demostrado la proteína incrementa considerablemente en estas condiciones (Bosch *et al.*, 1988). La expresión de estas proteínas puede verse también inducida por otros estímulos como la carencia de oxígeno, la presencia de metales pesados, agentes físicos y químicos o cualquier factor que produzca un estrés celular (Sanders, 1988). Sin embargo, las HSPs también parecen ser inducidas en presencia de patógenos. Encomio y Chu (2007) evaluaron HSP70 en ostiones infectados con *P. marinus* y no infectados durante 14 días en un gradiente de temperatura. Sus resultados demuestran modulación de HSP70 por efecto del parásito. Aunque la expresión de estas proteínas pudiera estar en relación al incremento del nivel de estrés ambiental asociado a los cambios de temperatura (Hofmann y Somero 1996), se ha demostrado que la expresión de las mismas puede verse también inducida por otros factores como la hipoxia (Ropp *et al.*, 1983), salinidad (González y Bradley 1994), metales pesados (Craig 1985), entre otros diferentes tipos de estrés.

La función de las HSPs en condiciones normales, está asociada a procesos de plegamiento proteico, donde actúan como chaperonas ayudando a la obtención de la

estructura tridimensional de las proteínas y teniendo un papel fundamental en procesos de desarrollo y de diferenciación celular (Schlesinger 1990; Hartl 1996).

#### *2.4.1.5 Inhibidores de serin proteasas involucrados en defensa*

Los inhibidores de serin proteasa (SPI) son una superfamilia que estructuralmente está relacionada a casi todos los organismos, desde los virus a los seres humanos (Rawlings *et al.*, 2004). Son poli-funcionales y están implicados en muchas rutas y procesos biológicos. La mayoría de SPI inhiben la actividad proteolítica de las proteasas de serina. Cualquier proceso que implica serin proteasas, incluyendo la digestión, la inflamación y la respuesta inmune, puede ser regulada por SPI (Silverman *et al.*, 2010). Durante la respuesta inmune, SPI puede regular al receptor Toll o inhibir las serin proteasas de la invasión de agentes patógenos que son a menudo factores de virulencia (Klemba y Goldberg, 2002). Así, algunas SPI pueden ser importantes para la resistencia a enfermedades en moluscos. Xue en 2008 reporto el primer inhibidor de serin proteasa aislado de *C. virginica* el cual más tarde caracterizó La Peyre (2010) e identificó como CvSI-1. Se demostró que posee fuertes efectos inhibidores sobre las serin proteasas del patógeno *P. marinus* e inhibe la proliferación del mismo *in vitro* (La Peyre *et al.*, 2010).

Por lo tanto, CVSI-1 está implicado en la defensa del huésped contra Dermo y nueva evidencia fortalece el principio de que los inhibidores de serin proteasa mejoran la supervivencia y/o resistencia contra *P. marinus*. Yu y colaboradores (2012) evaluaron 12 polimorfismos (SNP) en la secuencia codificante del inhibidor de serin proteasa las cuales permitieron asociar con organismos susceptibles y resistentes a *P. marinus*. He (2012) reporta una mutación en la región codificante

de CvSI-1 el cual confiere resistencia a *C. virginica* contra infecciones de *P. marinus*. Xue en 2009 caracterizó un nuevo inhibidor identificado como CvSI-2 el cual demostró ser un potente inhibidor de perkinsina (proteasa de perkinsus) e *in vitro* suprimió la propagación del parásito.

#### 2.4.2. Respuesta antioxidante

##### 2.4.2.1 Radicales de oxígeno.

La inactivación bacteriana y parasitaria en el interior de los fagocitos se efectúa mediante dos tipos de mecanismos: independientes de oxígeno, mediados por los fagocitos (enzimas lisosomales, catepsinas, defensinas, enzimas proteolíticas etc), y dependientes de oxígeno mediante la formación de compuestos oxigenados como peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), radicales como el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), productos que se forman durante el denominado estallido respiratorio que sigue a la activación de la enzima nicotinamidaadenín- dinucleótido-fosfato-hidrógeno (NADPH), oxidasa de la membrana tras la fagocitosis (Díaz, 2006).

Una de las características especiales de esta infección es la capacidad de los microorganismos *P. marinus* fagocitados de sobrevivir, y proliferar dentro del fagosoma, además de que se diseminan usando a los hemocitos como vehículos para migrar dentro del hospedero (Asojo *et al.*, 2006). La mayor actividad antimicrobiana y antiparasitaria es la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) durante la fagocitosis, sin embargo una pobre producción de ERO y/o su ausencia favorece al parásito, el cual posee un eficiente sistema de detoxificación de ERO o antioxidación (Volety y Chu, 1995). La detoxificación de ERO es una estrategia de defensa intracelular llevada a cabo por parásitos y consiste en catalizar



la conversión de ROS a especies menos nocivas mediante enzimas como la superóxido dismutasa (SOD) (De Groote *et al.*, 1997).

En estudios previos se ha demostrado que *P. marinus in vitro* produce altas cantidades de superóxido y peróxido de hidrogeno (Schott *et al.*, 2003). Wright (2002) sugiere que este parásito tiene la capacidad de neutralizar ROS dentro del fagosoma hemocitario. Por otro lado Goedken (2005) demostró que tras retar a la especie resistente (*C. gigas*) y susceptible (*C. virginica*) ante el parasito, ambas iniciaron el proceso de fagocitosis, estallido respiratorio y apoptosis, pero *C. gigas* accionó estos mecanismos a una mayor velocidad que *C. virginica*. Bushek (1997) encontró que el ostión del Este es poco eficiente en la eliminación del parasito pues una vez fagocitado se disemina mediante los hemocitos circulantes y posteriormente causar infección sistémica. Asojo (2007), explica que debido a una baja actividad de ERO durante la fagocitosis de *P. marinus* en *C. virginica* aunado a la capacidad detoxificadora del parasito, hace muy difícil la eliminación del mismo.

#### 2.4.2.2. Radicales de nitrógeno

Los moluscos son capaces de producir pequeñas cantidades de óxido nítrico (NO) a partir del aminoácido L-arginina mediante la acción del Oxido nítrico sintasa (NOS) (Rivero, 2006). NO, es una molécula señalizadora con actividad inmunoreguladora y antimicrobica (Rivero, 2006). La forma inducible de NOS es inmunológicamente más relevante pues es activada en respuesta a la presencia de virus, bacterias y estímulo parasitario, también tiene funciones de citosina

proinflamatoria (Korhonen *et al.*, 2005). En vertebrados existen 3 isoformas de NOS (endotelial o eNOS, neuronal o nNOS y la forma inducible iNOS), sin embargo en invertebrados no hay una clara distinción de estas isoformas (Jiang *et al.*, 2013). De acuerdo a Ivanina *et al.* (2010) la isoforma iNOS parece ser la estructura ancestral de NOS pues es a partir de esta que se generan las eNOS y nNOS de acuerdo a estudio evolutivo de estas moléculas mediante comparación de secuencias. La respuesta de NO ante la presencia de *P. marinus* en *C. virginia* fue evaluada por Villamil y colaboradores (2007) donde la inhibición de la misma permitió la proliferación del parásito, constatando el importante papel que juega NO como molécula anti-parasitaria. Altos niveles de NO son producidos en respuesta al estímulo inflamatorio y regula los efectos proinflamatorios y destructivos. La formación de especies reactivas de nitrógeno derivados de NO se incrementa en la inflamación en la presencia de células fagocíticas.

#### 2.4.3 Actividad apoptótica

El término "apoptosis" fue acuñado por Kerr, Wyllie y Curie en un artículo publicado en 1972 en el cual se describe la muerte celular programada (PCD). Fue definida únicamente por sus rasgos morfológicos como condensación de la cromatina, formación de ampollas en la membrana y encogimiento celular (Kerr *et al.*, 1972) . Desde entonces, el estudio de la apoptosis se ha usado en organismos modelo tanto en invertebrados como vertebrados en el cual se reconoce que es un proceso multifuncional, evolutivamente conservado y que juega un papel crítico en la homeostasis celular y tisular, el desarrollo embrionario y la defensa inmune en organismos multicelulares (Sokolova, 2009). A diferencia de la necrosis la cual

puede ser considerada como "muerte celular accidental" debido a los grandes daños mecánicos o químicos, la apoptosis es un proceso celular altamente orquestado en donde los componentes intracelulares son secuestrados y eliminados de una manera ordenada y sin la inducción de la inflamación. El estudio de los mecanismos de apoptosis se han basado predominantemente en modelos de *Caenorhabditis* y de *Drosophila* (Vermeulen *et al*, 2005). En moluscos estos mecanismos ha sido ampliamente documentado por Sokolova *et al.*, 2004; Sokolova, 2009; Kiss, 2010 y Hughes *et al.*, 2010.

La muerte celular por apoptosis en moluscos se puede activar a través de dos importantes vías intrínsecas y extrínsecas (Figura 6). Las intrínsecas o mitocondriales, se dan en respuesta al daño celular interno y la extrínseca, en respuesta a indicios de muerte recibidas desde el medio ambiente. Aunque ambas vías pueden funcionar de manera independiente, hay comunicación entre ambas que permite el envío de la señal de muerte celular (Feig y Peter, 2007) . Una característica clave de la mayoría de las vías de apoptosis es la participación de una familia de proteasas denominadas caspasas las cuales promueven el desensamble de la célula dirigida hacia proteínas que son cruciales tales como proteínas estructurales, de reparación de ADN e involucradas en la transducción de señal (Creagh *et al.*, 2003). Las caspasas implicadas en la apoptosis incluyen a las caspasas iniciadoras (caspasas 2, 8, 9 y 10) que inciden y activan a las caspasas efectoras (caspasas 3, 6 y 7), que a su vez actúan sobre blancos intracelulares que van desde las proteínas del citoesqueleto a estructuras celulares específicas como las mitocondrias, lámina nuclear o la cromatina (Hengartner 2000; Creagh *et al.*,

2003). Ambas vías de apoptosis (extrínsecas e intrínsecas) convergen en la activación de las caspasas, aunque debe tenerse en cuenta que también se puede producir la apoptosis independiente de caspasas (Kiss, 2010). El sello distintivo de la vía intrínseca de la apoptosis es la liberación de citocromo C que generalmente se acompaña de la formación de un poro en la membrana mitocondrial (MPT) y el colapso de la membrana de la mitocondria (Mignotte y Vayssiére, 1998). Los factores que dan lugar a la activación de la apoptosis a través de la vía mitocondrial incluyen daños en el ADN, daño oxidativo de las proteínas y lípidos, estimulación parasitaria, viral y/o eliminación de las señales promitógenas (Circu y Aw, 2008). Una vez en el citoplasma, el citocromo C interactúa con el factor de activación peptidasa apoptótica 1 (Apaf-1), la procaspasa 9 y dATP para formar un complejo llamado el apoptosoma que activa la caspasa iniciadora 9, que a su vez activa la molécula efectora la caspasa 3. La activación de la caspasa 3 causa la degradación de proteínas, ADN y otros componentes celulares que culminan en muerte celular (Zimmermann *et al.*, 2001).

La vía extrínseca de la apoptosis inicia a través de la unión de ligandos específicos de la proteína a los receptores de muerte en la superficie celular. En los vertebrados, se han descrito seis tipos principales de receptores de muerte los cuales incluyen: 1) Fas, 2) TRAIL (TNF relacionado al ligando inductor de apoptosis) receptor de 1 y 2, factor de necrosis tumoral (TNF) receptor 1, receptor de TNF relacionado con la mediación de apoptosis (TRAMP) y receptor de muerte 6 (DR6). La activación de receptores de muerte induce la formación del complejo de señalización de inducción de muerte (DISC) que activa la caspasa 8 la cual conduce a la inducción

de la apoptosis (Zimmermann *et al.*, 2001; Schultz y Harrington, 2003). A pesar del papel central de las caspasas en la vías apoptóticas intrínseca y extrínseca, la activación de la caspasa no es un requisito absoluto para la inducción de la muerte celular programada. Las más prominentes moléculas efectoras de la muerte celular independiente de caspasas son: factor inductor de apoptosis (FIA) y las endonucleases G (ENDOG) (Tait y Green, 2008). Tanto FIA como ENDOG se liberan desde las mitocondrias hacia el sitio donde se emitió la señal de muerte, se unirán al ADN e inducirán a la caspasa que causará la de condensación de la cromatina y fragmentación del ADN con lo cual se conduce a la muerte celular (Van Loo *et al.*, 2001). Hughes y colaboradores (2010) demostraron *in vitro* que hemocitos de ostión infectados con *P. marinus* inician sus primeros minutos de contacto con el parásito con una fuerte respuesta inmune y que después de 45 minutos y hasta 2 horas post-infección *P. marinus* induce a la apoptosis. Posteriormente la actividad apoptótica se reduce gracias a un mecanismo de inducción del propio parásito. Años atrás Sunila y Labanca (2003) encontraron una gran cantidad de hemocitos apoptóticos en organismos no infectados mientras que los infectados con *P. marinus* redujeron el número de hemocitos apoptóticos, lo que sugiere un papel inhibitorio de la inducción de la apoptosis de los hemocitos del ostión.

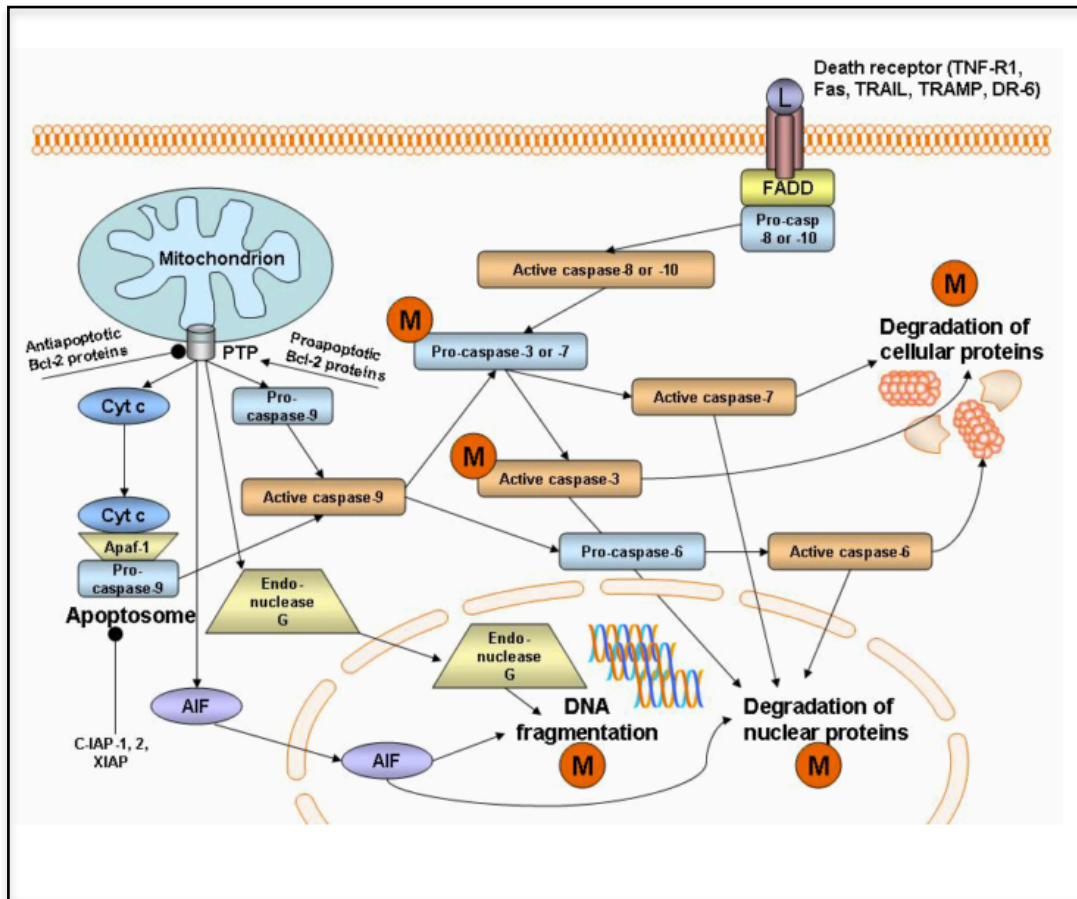


Figura 6. Representación de la apoptosis. La ruta intrínseca (Origen mitocondrial) se muestra del lado izquierdo y la vía extrínseca (Activación de receptores de muerte) se muestra del lado derecho. Ambas vías se comunican, flechas indican activación y líneas con puntos inhibición, círculos rojos con la letra “M” indica las partes de la ruta que han sido demostrada en moluscos. Abreviaciones: Poro permeable, PTP; Citocromo C, Cyt c; procaspasa, Pro-casp; Receptor Fas, FADD; Peptidasa apoptótica activadora del factor 1, Apaf-1; Factor inductor de apoptosis, AIF; Proteína inhibidora de la apoptosis, IAP. Tomado de: Sokolova 2009.

## 2.5 Factores de virulencia

Este concepto trata de la interacción entre el hospedero y su patógeno el cual compromete la competencia y eficacia de los mecanismos de defensa del huésped que lucha contra el patógeno (resistencia) y las estrategias de

supervivencia (mecanismos de virulencia y factores ) empleados por los patógenos. Para sobrevivir en el huésped, los agentes patógenos utilizan diferentes mecanismos evasivos, incluyendo: 1. Estallido respiratorio o destrucción tóxica mediante compuestos generados por el metabolismo oxidativo de los fagocitos, 2. Invasión y adquisición de nutrientes para el crecimiento a través de la secreción de enzimas lipolíticas y proteolíticas, 3. Huida de la actividad hidrolítica de los lisosomas; y 4. modificación de la integridad de la superficie utilizando lípidos y ácidos grasos (Rivero, 2006).

#### 2.5.1 *Productos extracelulares (ECP)*

Los productos extracelulares fueron estudiados en cultivos *in vitro* de *P. marinus* por La Peyre en 1995. Estos productos se encuentran encapsulados en liposomas, y mostraron incrementar la infectividad de *P. marinus* (La Peyre *et al.* , 1996). Experimentos *in vitro* han demostrado que los ECP no sólo reducen el número de hemocitos sino también la respuesta humoral, incluyendo la producción de ROS, la movilidad, la cantidad de lisozima y la hemaglutinación (Garreis *et al.*, 1996), además de la actividad vibriocida de los hemocitos (Tall *et al.*, 1999). La disponibilidad de anticuerpos policlonales comerciales contra las ECP facilita la detección *in vivo* de varios componentes de *P. marinus*. De hecho, la concentración de ECP en los tejidos de ostión, estimada mediante el ensayo ELISA, correlaciona con los niveles de carga parasitaria calculada por WBBA (Ottinger *et al.*, 2001). Los ECP están constituidos principalmente por proteasas de serina, que fueron propuestas como posibles factores de virulencia responsables de la degradación del tejido de las ostras infectadas (La Peyre *et al.*, 1996). El hallazgo

de que la bacitracina, un inhibidor de la proteasa, redujo significativamente la infectividad *P. marinus* y su crecimiento *in vitro* confirmaron indirectamente la implicación de proteasas de serina como factor de virulencia en este parásito (Faisal *et al.*, 1999). Además, hay evidencia de que estas proteasas de serina son potencialmente contrarrestados por inhibidores producidos por ostras infectadas.

### 2.5.2 Proteasas de serina

Las proteasas son sintetizadas por parásitos protozoarios y se han caracterizado a nivel molecular y celular. La función primordial de las proteasas es el facilitar algunos procesos como la invasión de la célula huésped y la salida, enquistamiento, exquistación, el catabolismo de las proteínas del huésped, la diferenciación, la progresión del ciclo celular y cito-adherencia (Klemba y Goldberg, 2002). Las proteasas son reconocidas como factores críticos en la patogénesis de la enfermedad, la inmunidad y las interacciones parásito-hospedero (Meza, 2000; Klemba y Goldberg, 2002 ). Las proteasas producidas por los parásitos están involucrados en el proceso de infección (Rosenthal *et al.*, 1987), facilitando la penetración a través de los tejidos del huésped y la liberación de nutrientes (McKerrow *et al.*, 1993 ) gracias a la activación de las proteínas e inhibidores que participan en la defensa inmune (Corradin *et al.*, 2002 ). Los parásitos de la especie *Perkinsus* secretan *in vitro* tanto serin proteasas (La Peyre *et al.*, 1995; Ordas *et al.*, 2001) como proteínas que afectan seriamente la respuesta inmune de los ostiones (Garreis *et al.*, 1996). La sobreproducción de estas enzimas puede ser fatal para las células y para el organismo en su conjunto, pues reducen la actividad de lisozimas,



la actividad aglutinante (La Peyre *et al.*, 1996) y causa alteraciones en la permeabilidad de la membrana celular (Paynter *et al.*, 1995). Debido a la presencia de estas proteasas exógenas y a la necesidad de un control de la actividad de las endógenas, los moluscos han desarrollado unas enzimas conocidas como Inhibidores de Proteasas (PI) (Laskowski y Kato, 1980). El papel de las PI es minimizar y bloquear el establecimiento de la infección parasitaria para evitar su propagación (Calkins y Sloane, 1995).

Por lo anterior, en el presente trabajo nos dimos a la tarea de cultivar al parásito *P. marinus* el cual induce la expresión de genes relacionados a la respuesta inmune, e infectamos ostiones de las especies *C. virginica* (suceptible) y *C. corteziensis* (potencialmente tolerante/resistente), a fin de conocer como se el papel de defensa ante el patógeno.

### 3. OBJETIVO GENERAL

Describir diferencias entre los mecanismos moleculares vinculados a la respuesta inmune entre una especie susceptible (*Crassostrea virginica*) y en una especie aparentemente tolerante (*Crassostrea corteziensis*) a la infección provocada por *Perkinsus marinus*.

#### 3.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer el modelo de infección experimental con el parasito *Perkinsus marinus* contra el Ostión del placer *Crassostrea corteziensis* y Ostión americano *Crassostrea virginica*.
2. Validar el éxito de la infección experimental mediante métodos diagnósticos.
3. Diagnostico histopatológico de organismos experimentales. después de las infección experimental.
4. Evaluar genes relacionados a respuesta inmune, actividad antioxidante y apoptosis.
5. Validar genes seleccionados que se expresan de manera diferencial durante el proceso de infección.

## 4. METODOLOGIA

**Objetivo 1: Establecer un modelo de infección experimental de *Crassostrea corteziensis* y *C. virginica* por el patógeno *Perkinsus marinus***

### 4.1 Infección experimental

*I. Cultivo del parásito Perkinsus marinus* (Ver Anexo A).

Parásitos de *P. marinus* fueron aislados de ostiones recolectados de granjas ostrícolas del Estado de Nayarit. Los ostiones se disectaron y se utilizaron las branquias, el manto y el recto como tejidos proveedores del parásito. El diagnóstico inicial fue por PCR de punto final utilizando oligonucleótidos sugeridos por la Organización Mundial de Salud Animal (OIE) para la detección de *P. marinus*. Los tejidos antes mencionados fueron lavados con agua de mar estéril y colocados en una mezcla de antibióticos y antimicóticos durante 30 minutos. Después del lavado se colocaron en agua de mar estéril y sembrados en medio de cultivo Ham enriquecido con nutrientes Ham-F12 en frascos de cultivo en un horno de incubación (Lab Line, USA) a 28°C durante 7 días. El cultivo fue tratado con antibióticos y antimicóticos durante toda sus etapas. Durante el primer mes se realizaron subcultivos semanales acompañados de una evaluación de viabilidad y conteo mediante diluciones seriadas las cuales eran teñidas con el medio de contraste rojo neutro. La cuantificación se realizó en una cámara Neubauer. El método fue modificado a partir de los trabajos publicados por: Casas *et al.*, 2002; Earnhart *et al.*, 2004 y Casas *et al.*, 2008.

## *II. Animales y su mantenimiento.*

Los organismos fueron colectados en dos localidades (Golfo de California y Golfo de México). El ostión del placer *C. corteziensis* (n=50) se obtuvo de granjas de producción ostrícola ubicadas en el municipio de Topolobampo Sinaloa y el ostión americano *C. virginica* (n=50) se colectaron en granjas ubicadas en el municipio de Paraíso Tabasco. Los ostiones fueron transportados en bolsas con agua a temperatura ambiente (aprox. 26°C) al laboratorio húmedo del Departamento de Acuicultura del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Sinaloa (CIIDIR) en Guasave Sinaloa. Previo a la transportación de los organismos se instalaron 4 tinas de plásticos con capacidad de 200 litros las cuales fueron llenadas a un cuarto de su capacidad con agua hipersalina, ajustada a una salinidad 26 ppm con agua de grifo filtrada. La temperatura osciló entre una mínima de 24°C y máxima de 29°C durante la cuarentena y el experimento. Se colocaron 20 ostiones de tallas homogéneas (7.2 cm  $\pm$ 1.2) en cada tanque. La alimentación fue a base de producto comercial Shellfish Diet 1800 ofrecido por Reed Mariculture Inc (Campbell, Ca, USA) proporcionando diariamente dos raciones de  $2 \times 10^6$  células de microalgas por ostión como dieta de mantenimiento. Las tinas se limpiaban diariamente mediante “sifoneo” y los organismos inspeccionados visualmente. Todo el agua residual fue tratada con cloro comercial al 10% y vertida en una alberca de arena. El periodo de aclimatación fue por 2 semanas y durante este tiempo se tomaron 5 organismos de cada especie para diagnosticar la presencia y cantidad de *P. marinus* previo al reto.

### *III. Diagnostico de los organismos previo al reto (Ver anexo B).*

Un total de 5 ostiones de cada especie fueron disectados. Se estimó el peso fresco (organismo desconchado) y se colectaron 100 mg de branquias, manto y glándula digestiva en tubos de 1.5 ml en alcohol absoluto para su posterior extracción de ADN y diagnostico por PCR. Un corte diagonal fue realizado con el propósito de tener representado todos los tejidos, éste fue fijado en Solución Davidson para procesamiento histológico. El resto del tejido se peso nuevamente y se colocó en Medio con Tioglicolato para la estimación de la carga parasitaria mediante la técnica Carga Parasitaria del organismo completo o “Whole Body Burden Assay” por sus siglas en ingles WBBA de acuerdo a lo descrito en el manual de diagnostico de la Organización Mundial de Salud Animal (OIE) en 2006, Almeida (1999) y Bushek (1994). Los resultados de la carga parasitaria se expresaron en cantidad de parásitos u hipnosporas por gramo de peso húmedo (p.gph ) y adicionalmente como índice de infección parasitaria de acuerdo a la escala propuesta por Mackin en 1962 y modificada por Craig y colaboradores en 1989, en la cual se establece un valor de 0 para organismos libres del parásito hasta 5 para los organismos fuertemente infectados. Su estimación se basa de acuerdo a Craig (1989) multiplicando el numero de esporas por el factor de dilución y este resultado se divide por el peso húmedo del organismo. El resultado es la estimación de la intensidad de la infección expresado en valores numérico de entre 0 y 5, siendo 0 ausente del patógeno y 5 severamente infectado.

*IV. Infección experimental.* (Protocolo completo ver Anexo A).

Después del periodo de cuarentena, los ostiones fueron inoculados con  $1 \times 10^6$  células de *P. marinus* colocadas en la cavidad de la concha. Para esto fue necesario realizar lo siguiente:

*Evaluación de la viabilidad, estadio y conteo del parásito.* Volúmenes de 50 ml de medio de cultivo DME-F12 fueron centrifugados para separar los parásitos del medio de cultivo, posteriormente el pellet que contenía los parásitos fueron resuspendidos en agua de mar estéril y mantenidos a 28°C por una semana con el propósito de iniciar su activación en agua de mar ausente de nutrientes. Previo a la incubación se tomaron alícuotas y fueron teñidas con rojo neutro y observadas en cámara Neubauer donde se cuantificaron. Una semana después de la incubación, los tubos con agua de mar estéril y parásitos fueron centrifugados nuevamente y concentrados en un volumen de 1 ml de agua de mar estéril. De cada uno de los tubos se tomaron 3 alícuotas teñidas con rojo neutro para evaluar viabilidad y colocados en cámara Neubauer para estimar la cantidad.

*Preparación de las cargas parasitarias.* Una vez que se obtuvieron las concentraciones se realizaron las diluciones con agua de mar estéril hasta alcanzar  $1 \times 10^6$  células de protozooario *P. marinus*. Se utilizaron jeringas para insulina de 1 ml (BD, México) a las cuales se les corto la punta de la aguja a fin evitar posibles daños al tejido de los ostiones. Cada carga de parásitos fue concentrada en 200  $\mu$ l de agua de mar estéril.

*Preparación de los organismos.* Los ostiones fueron tomados de las tinajas en grupos de 5 individuos y transportados en cubetas con agua de mar al laboratorio donde se realizó la inoculación. Uno por uno fueron cortados por la concha con una

navaja rotatoria (Dremel, USA) hasta alcanzar las valvas. Una vez conseguido el objetivo se inoculó un volumen de 200ul de agua de mar estéril conteniendo  $1 \times 10^6$  células de *P. marinus* por ostión. Posterior a esto, los ostiones se mantuvieron a temperatura ambiente fuera del agua por 1 hora y después colocados en sus respectivas tinas. Los ostiones considerados control recibieron una inyección de 200ul de agua de mar estéril sin parásitos. La carga parasitaria inoculada fue basado de acuerdo a los trabajos de Bushek *et al.*, 2002; Moss *et al.*, 2006 y Shimokawa *et al.*, 2010.

*Tiempo de infección y toma de muestras.* Fueron 4 las tinas utilizadas durante el experimento cada tina conteniendo 15 organismos, 2 de ellas con ostión americano *C. virginica* (CV) y 2 más con ostión del placer *C. corteziensis* (CC) ver tabla 2. Cada una de las dos tinas por especie contenían ostiones experimentales (+) y la otra tina ostiones control (-) (Tabla 1).

Clave	Especie	Condición
CC +	<i>Crassostrea corteziensis</i>	Infectado
CC -	<i>Crassostrea corteziensis</i>	No infectado
CV +	<i>Crassostrea virginica</i>	Infectado
CV -	<i>Crassostrea virginica</i>	No infectado

Tabla 2. Identificación de los grupos experimentales de acuerdo a su especie.

### *V. Toma de muestras*

Se colectaron 5 organismos de cada condición en cada tiempo seleccionado siendo el día cero (D0) los llamados organismos control. El séptimo día (D7) se colectaron igualmente 5 individuos de cada condición y el día catorce (D14) nuevamente se colectaron 5 individuos de todas condiciones del experimento. Todos los ostiones del experimento fueron pesados y medidos, posteriormente se tomaron las muestras como a continuación se describe:

*Para el diagnóstico molecular:* Aproximadamente 100 mg de los siguientes tejidos Branquia, manto y Glándula Digestiva. Todos colocados en un tubo de 1.5 ml conteniendo 1 ml de alcohol absoluto (Sigma-Aldrich, USA).

*Para análisis de la expresión génica:* 500ul de Hemolinfa, aproximadamente 100 mg de los siguientes tejidos branquia, manto y glándula digestiva todos colocados en tubos diferentes conteniendo 500 ul de RNA later (Life Technologies, USA).

*Para análisis histológico:* Se realizó un corte diagonal donde la mayoría de los tejidos estaban representados. Los tejidos se colocaron en cassettes para histología en 2 frascos de 5 litros conteniendo Solución Davidson (Histologia H&E) y solución fijadora de Paraformaldehído al 4% (Hibridación in situ) de acuerdo a Humason (1979), Shaw y Battle, 1957.

*Cuantificación de la carga parasitaria (Whole Body Burden Assay).* El resto del tejido fue pesado y colocado en tubos de 50 ml conteniendo aproximadamente 20 ml de Medio Tioglicolato (RFTM), antibióticos y antimicóticos. El tubo fue cubierto de papel aluminio y mantenido en un gabinete oscuro durante una semana (Ver anexo B).



**Objetivo 2: Validar el éxito de la infección experimental mediante métodos diagnósticos.**

4.2 Validación de la infección

*I. Cuantificación de la carga parasitaria, índice de infección. (Ver anexo B).*

Los tejidos de ostión fueron incubados en medio tioglicolato durante 7 días en obscuridad. Después de este periodo se eliminó por centrifugación el medio de cultivo y se resuspendió el tejido con Hidróxido de Sodio 2M (2M NaOH). Se mantuvo en incubación de 2 a 3 hrs a 60°C hasta que el tejido se digiriera en su totalidad. Después de la digestión se extrajo el NaOH mediante centrifugación y el tejido se resuspendió en agua bidestilada, finalmente se eliminó el agua por centrifugación y se vertió 1 ml de agua bidestilada con Lugol parasitológico diluido 1:10 (Albor, México). Se tomaron 3 alícuotas de 100 ul y se virtieron en filtros de celulosa de 0.45uM (Whatmann , EUA) los cuales se observaron al microscopio para iniciar el conteo. Diluciones seriadas son requeridas si se encuentran cantidades superiores a 25 esporas por campo. Esta técnica fue desarrollada y modificada a partir del trabajo publicado por el manual de diagnostico de la OIE en 2009 y Bushek y colaboradores (1994). La carga parasitaria se midió en numero de parásitos u hiposporas por gramo de peso húmedo (p\*gph ). Los niveles de intensidad de infección se estimaron de acuerdo al método de Craig y colaboradores (1989) los cuales se basan en la cantidad de hiposporas estimadas en el organismo expresadas en valores de 0 a 5 (Tabla 2).

## *II.-Extracción de ácidos nucleicos (ver anexo B).*

Los tejidos fijados en alcohol absoluto fueron utilizados para la extracción de ADN mediante el método de precipitación por sales (Salting out) y proteínasa K (Quiagen, Alemania) el cual es un método modificado a partir del trabajo publicado por Martínez y colaboradores (1998). El ADN una vez aislado fue cuantificado y ajustado a una concentración final de 100 ng/ul, la concentración fue calculada en un equipo Nanodrop 2000 (ThermoScientific, EUA). La integridad del ADN fue evaluada mediante PCR usando oligos que amplifican el ARN 18S ribosomal del ostión (18SF 5'-GTT AAT TCC AGC TCC AAT AGC GTA-3' y 18SR -5' GAA CTA CGA CGG TAT CTG ATC- 3).

## *III. Diagnostico Molecular (Anexo C).*

Adicionalmente y con el propósito de confirmar si los organismos fueron infectados con el parásito, se realizaron pruebas diagnósticas usando oligos sugeridos por la OIE en su Manual de pruebas diagnosticas (2008). Los oligonucleótidos NTS amplifican regiones espaciadoras no transcritas del ARN ribosomal (NTSF 5' -CAC TTG TAT TGT GAA GCA CCC- 3'y NTSR 5'- TTG GTG ACA TCT CCA AAT GAC- 3') con un producto esperado de 304 pb (OIE, 2009). Todos productos de PCR fueron observados en electroforesis en agarosa 2% teñido con bromuro de etidio (0.5 ug/ml) (Sigma-Aldrich, EUA) y como referencia se utilizó el marcador de peso molecular  $\Phi$ X174/HaeIII (Promega, EUA). Las bandas obtenidas fueron documentadas en el transiluminador de luz UV Gel-Pro Imagen (Hitech Technologies, EUA ).

#### *IV. Identificación molecular de la variante de P. marinus.*

Para identificar la variante empleada en la infección experimental se utilizó los oligonucleotidos que amplifican una porción ITS (Internal Transcribed Spacer) reportados por Park y colaboradores (2006), PerkITS1F (5'-GAG ATG GGA TCY CCG CTT TGT TT-3') y PerkITS1R (5'- GAA TCG CGT GAT CRA GGA ACA CG-3') los cuales amplifican 532 pb.

#### *V. Carga parasitaria por PCR cuantitativo qPCR (Anexo C).*

Con el propósito de encontrar diferencias entre los organismos infectados y no infectados, se utilizó un Sistema de Detección de Secuencias (PCR en tiempo real) ABI 7000 (Applied Biosystems, EUA) utilizandola química Sybr Green (Life Technologies, EUA). ® ) y oligonucleótidos que amplificaban una porción del NTS de *P. marinus*. Los oligonucleótidos empleados para qPCR fueron los siguientes: NTSqF 5'-GTC AAA GAT GCT CGC GAA-3' y NTSqR 5'-TTG GTG ACA TCT CCA AAT GAC-3'. En cada muestra se revisó que la eficiencia de amplificación (<95%), temperatura de disociación y que componentes de la reacción fueran aceptables (Fluorescencias Sybr y Rox).

### **Objetivo 3. Diagnostico histopatológico de organismos experimentales.**

#### 4.3 Diagnóstico histopatológico

##### *I. Histología (Anexo D)*

Los tejidos de ostión se fijaron en solución de Davidson e incluidos en parafina. Las muestras fueron cortadas y teñidas con Hematoxilina y Eosina (Humason 1972). Cada laminilla histológica se observó en un microscopio óptico (Leica Olympus ® BX41) conectado a una cámara de video (CooISNAP - ProColor™). Las imágenes se digitalizaron usando un software de análisis de imagen (Image Pro ® Plus versión 4.5, Media Cybernetics, USA).

Las muestras positivas para *P. marinus* fueron evaluadas de acuerdo a las alteraciones de los tejidos asociados a la infección. Se establecieron tres categorías para la estimación de la intensidad de la infección:

Infección ligera (1): cuando se observan parásitos sólo en el epitelio o en algunas áreas del intestino pero sin infiltración hemocítica o destrucción de los tejidos.

Infección moderada (2): cuando la infección ocurre en los epitelios de algunas áreas del intestino y en el tejido conectivo mas infiltración de hemocitos focalizada.

Infección severa (3): la infiltración de hemocitos es generalizada y se observan diferentes etapas del desarrollo del parásito invadiendo el intestino, el tejido conectivo que rodea la glándula digestiva, manto y branquias .

## II. *Hibridación in situ* (Ver anexo D).

Los tejidos fueron fijados en paraformaldehído al 4% y se analizaron para determinar la presencia de *P. marinus* usando un método de hibridación in situ ( ISH ) según Le Rox *et al.* (1999). La sonda fue diseñada a partir de una clona conteniendo el fragmento de ADN de interés (NTS) y marcada con digoxigenina -dUTP utilizando el sistema Dig Nucleic Acid Detection Kit (Roche, Alemania). Para la hibridación de los inhibidores de serin proteasas se utilizó un plásmido recombinante para la preparación de ribosondas, utilizando un ARN DIG Etiquetado Kit ® ( SP6/T7 ) de Roche Applied Science (Penzberg, Alemania). Las secciones de tejido se incluyeron en parafina después de los bloques de deshidratación y de tejido se cortaron (4 micras) y se montaron en portaobjetos de POLYPREP (Sigma-Aldrich, EUA). Varias secciones continuas fueron preparados para cada bloque de tejido y desparafinaron con xileno, posteriormente se deshidrataron a través de una serie de lavados de alcohol, inmersiones en PBS (pH 7,3 ) y posterior incubación a 37° C durante 15 minutos en PBS que contenía 10 mg / ml de proteinasa K. Después de lavar dos veces en PBS el tejido se sumergió en solución de hibridación que contenía la sonda y se incubaron a 42 ° C durante la noche en una cámara de humedad. La contratinción se realizó con café de Bismark (Sigma Aldrich, EUA).

**Objetivo 4. Evaluar genes relacionados a respuesta inmune, actividad antioxidante y apoptosis.**

4.4 Amplificación de genes

*I. Extracción de ARN (ver Anexo E).*

Tejidos fijados en RNA later fueron usados para extraer ARN total mediante el método Trizol (Invitrogen, EUA) y co-precipitadores como ARN de transferencia de levaduras (tRNA) (Ambion, EUA) y Cloruro de litio 4M (Sigma-Aldrich, EUA). La verificación de la integridad del ARN fue mediante electroforesis en TAE estéril en condiciones similares a las descritas para productos de PCR y la documentación de geles se realizó utilizando el programa Image Pro (Media Cybernetics, USA)

*II. Síntesis de ADN complementario.*

La retrotranscripción se realizó mediante el sistema Improm II (Promega, USA) utilizando en todos los casos 3 ul de ARN total. El cDNA se obtuvo por dos vías usando oligo d(T) y hexámeros al azar. Todo el ARN retrotranscrito fue cuantificado y ajustado a 100 ng/ul y evaluada su integridad mediante PCR. La verificación de la integridad fue posible realizando PCR con oligos específicos de acuerdo del tipo de material retrotranscrito. Para ADNc con hexámeros al azar se utilizaron oligos que amplifican una porción del 28S Ribosomal (28S F 5'-ACC CGC TGA ACT TAA GCA TA-3' y 28S R 5' CTT TGG GCT GCA TTC TCA A-3'), mientras que para el ADNc con oligo d(t) se usaron oligos de B-actina.

En todos los casos los productos de PCR fueron observados y documentados como se ha descrito anteriormente.

### III. *Evaluación de genes de interés.*

Se diseñaron oligonucleotidos (ver Anexo C) que amplificaron genes involucrados en 3 procesos de la respuesta a patógenos por moluscos: Respuesta inmune, actividad antioxidante y apoptosis. Los genes fueron elegidos de acuerdo a la revisión bibliográfica, sin embargo los oligonucleótidos fueron diseñados a partir de las secuencias reportadas en Genbank con el propósito de establecer condiciones de termociclado. Debido a que no habían secuencias disponibles de *C. corteziensis* en la base de datos, se diseñaron oligos degenerados a partir de las secuencias disponibles de los generos *Crassostrea* y *Sacrostrea* (Benson *et al.*, 2006). Las secuencias fueron alineadas con el programa en línea Multalin (Corpet, 1988). Una vez elegidas las regiones consenso se utilizó el programa primer 3 para el diseño de oligos (Rozen y Skaletsky, 1998). Todos los oligos fueron probados tanto en ADN como ADNc de ambas especies en ambas condiciones experimentales. Todos los genes, secuencias, número de acceso, etc se enlistan en el Anexo F.

Respuesta inmune:

1. Inhibidor de la serin proteasa tipo I (SPI-1)
2. Inhibidor de la serin protease tipo II (SPI-2)
3. Proteína de choque térmico 70 (HSP70)
4. Factor de necrosis tumoral (TNF)
5. Oxido nítrico sintasa (NOS)
6. Receptor Tipo TOLL (Toll)

Actividad antioxidante:

7. Super oxido dismutasa Cu/Zn (SODcuzn)
8. Super oxido dismutasa Mn (DODmn)
9. Glutación peroxidasa (Gpx)

Apoptosis:

10. Caspasa 1 (Casp1)
11. Caspasa 3(Casp3)
12. Receptor FAS (Fas)
13. Proteina inhibidora de la Apoptosis (IAP)

Genes de referencia

14. Beta actina (B-act)
15. Factor de elongación alfa (EF1a)
16. 18S ARN Ribosomal (18S)
17. 28S ARN Ribosomal (28S)
18. Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)



#### IV. *Amplificación, clonación y secuenciación de genes* (Ver Anexo C).

Genes que amplificaron en el cDNA de ostiones infectados y no infectados en el experimento, fueron secuenciados por método Sanger en MacroGen-Korea ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)). A partir de estas secuencias se diseñaron oligos específicos los cuales fueron probados nuevamente en ambas especies (*C. corteziensis* y *C. virginica*) y en ambas condiciones (infectados y no infectados). Los productos de PCR fueron purificados con el kit Wizard SV Gel and PCR clean up (Promega, USA), clonados usando bacterias DH5 $\alpha$  subcloning efficiency (Invitrogen, USA) usando un vector de clonación P-gem T easy (Promega, EUA). Las clonas positivas fueron verificadas por digestión con enzimas de restricción Eco RI (Promega, EUA) y por PCR usando oligos del vector SP6 y T7 (Promega, EUA). Las clonas verificadas fueron enviadas para su secuenciación a las instalaciones de MacroGen en Corea de Sur.

#### V. *Genes de referencia.*

Se realizó un ensayo a fin de elegir el gen de referencia más adecuado para este ensayo utilizando las diferentes especies, tejidos y condiciones. Se realizaron diversas corridas en el equipo de tiempo real usando a ambas especies y ambas condiciones buscando el gen de referencia que tuviera menor variación del valor conocido como Ct. Los datos fueron evaluados usando el algoritmo Genorm (Vandesompele *et al.*, 2002). Los genes probados fueron: Beta actina, Factor de elongación alfa, 18S ARN Ribosomal, 28S ARN Ribosomal, Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

**Objetivo 5. Validar genes seleccionados que se expresan de manera diferencial durante el proceso de infección.**

4.5 Expresión génica

*Evaluación de la expresión génica por PCR cuantitativo.* (Ver anexo C). A partir de los oligonucleótidos específicos se realizó el PCR cuantitativo con la química Sybr Green con Rox como referencia pasiva (Life Technologies, EUA). En todos los casos se usó 1ul de ADNc a 100ng/ul y se empleó el gen 28S Ribosomal como referencia para los cálculos posteriores. Todos los ostiones de los días 7 y 14 fueron calibrados con D0 (Control) de su respectiva especie. El coeficiente de variación (CV) se calculó de acuerdo a la ecuación  $CV\% = SD/(1+E)^{-Ct}$ . La expresión génica se estimó mediante el método comparativo  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  de acuerdo a la guía titulada “Applied Biosystems Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR” publicada en 2008. Para estimar diferencias entre carga parasitaria, días, tejidos y especies se utilizó el paquete estadístico STATISTICA (Statsoft, 2010) empleando ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey. Diferencias significativas fueron consideradas cuando ( $p < 0.05$ ) fue encontrado.

## 5. RESULTADOS

### **Objetivo 1: Establecer un modelo de infección experimental de *Crassostrea corteziensis* y *C. virginica* por el patógeno *Perkinsus marinus***

*Cultivo del parásito.* Los parásitos de *Perkinsus marinus* se obtuvieron a partir de ostiones infectados colectados en el estado de Nayarit de granjas acuícolas donde se cultiva la especie *C. corteziensis*. Los parásitos fueron cultivados exitosamente. Después de 4 semanas de crecimiento *in vitro* se obtuvieron aproximadamente  $40 \times 10^6$  trofozoitos de *P. marinus*. La viabilidad de las células varió a lo largo del cultivo obteniendo hasta el 50% de células viables en su valor mínimo y de un 90% en el máximo. Durante la activación del parásito se realizaron pruebas de viabilidad obteniendo un total de  $25 \times 10^6$  trofozoitos en condiciones de ser inoculados (Figura 7).

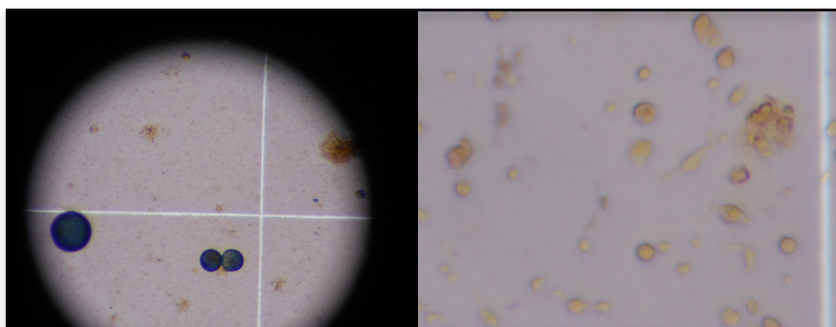


Figura 7. Cultivo de *P. marinus*. Semanalmente se realizaban conteos con el propósito de estimar la concentración de células y realizar subcultivos. En la imagen células de *P. marinus* con y sin tinción.

*Animales y su mantenimiento.* Durante el tiempo de cuarentena y el experimento no hubo crecimiento de los ostiones pues solo recibían dieta de mantenimiento. No se registraron mortalidades durante este periodo en ninguna de las 4 condiciones en las cuales se desarrolló el reto (Figura 8).



Figura 8. Sistema experimental. Un total de 4 tinas contenían cada una a una especie con y sin parásitos inoculados. La alimentación se realizó por un sistema de goteo en el que se garantizaba la ingesta de microalgas en dos ocasiones al día. No se registraron mortalidades durante el reto.

*Diagnóstico de P. marinus en ostiones previo al reto.* Un total de 10 organismos de cada especie fueron sacrificados para realizar el diagnóstico e identificación molecular del parásito. La prevalencia en ambas especies fue del 100% y la secuenciación de los productos de PCR demostró que ambas especies tenían alta similitud al aislado de *P. marinus* de Texas (AF497479) en un 96% para *C. corteziensis* y 98% en *C. virginica*. La cuantificación de parásitos mediante la técnica WBBA demostró que *C. corteziensis* tenía una carga parasitaria de  $130 \pm 26$  parásitos por gramo de peso húmedo (p.gph) y un índice de infección 0.89, la cual es considerada infección ligera. Mientras que *C. virginica* tuvo  $1027 \pm 173$  p.gph y un índice de 2.11 que corresponde a una infección ligera-moderada.

*Identificación molecular de la variante de P. marinus.* Los parásitos cultivados y activados fueron identificados molecularmente. La secuenciación de la región NTS demostró una similitud del 98% a la cepa de *P. marinus* aislada de Texas (Acceso Genbank AF497479), mientras que ITS fue del 99% para el mismo genotipo (Figura 9).

Perkinsus marinus strain TXsc 5S ribosomal RNA gene, partial sequence; small subunit ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence  
Sequence ID: [gi|20428526|gb|AF497479.1|](#) Length: 3816 Number of Matches: 2

**A** [Related Information](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
472 bits(255)	6e-129	267/272(98%)	3/272(1%)	Plus/Plus

Perkinsus marinus strain TXsc 5S ribosomal RNA gene, partial sequence; small subunit ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence  
Sequence ID: [gb|AF497479.1|](#) Length: 3816 Number of Matches: 1

**B** [Related Information](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
889 bits(481)	0.0	483/484(99%)	0/484(0%)	Plus/Plus

Figura 9. Resultado de similitud de las regiones NTS e ITS. A: Resultado de NTS 98% de similitud con respecto a la variante de Texas. B: Resultado de ITS 99% similitud con respecto a la misma variante.

*Infección experimental.* Se inocularon  $1 \times 10^6$  células de *P. marinus* a cada uno de los organismos del experimento. Los ostiones control recibieron una dosis de agua de mar estéril, se mantuvieron por 2 horas fuera del agua y posteriormente fueron introducidos en sus respectivas tinas. No se observaron problemas en los ostiones posterior a este paso (Figura 10).



Figura 10. Inoculación de *P. marinus*. En cada organismo se realizó un corte en el extremo de la cavidad usando un esmeril y se inocularon los parásitos. No se reportaron mortalidades con los ostiones posterior a la infección.

## Objetivo 2: Validar el éxito de la infección experimental mediante métodos

### diagnósticos.

*Estimación de índice de infección (Escala de Mackin) y Carga parasitaria por WBBA.* Se realizó la estimación del índice de infección de acuerdo a la escala de Mackin en los 15 organismos de cada especie después de días 0, 7 y 14 (D0, D7, D14). Los resultados se presentan en la tabla 3 en la cual se incluye el índice de infección y el porcentaje de similitud al genotipo de *P. marinus* de Texas. La carga parasitaria para *C. corteziensis* fue en D0 de  $73 \pm 25$ , D7  $19,230 \pm 5546$  y D14  $14,811 \pm 4461$  p.pgh. Por otro lado *C. virginica* tuvo una carga parasitaria inicial de  $842 \pm 82$ , en D7  $27,073 \pm 7493$  y para D14 de  $25,172 \pm 6219$  p.pgh (Figura 11).

Tiempo	<i>C. corteziensis</i>			<i>C. virginica</i>		
	Índice	% similitud		Índice	%similitud	
		ITS	NTS		ITS	NTS
D0	0.90 $\pm$ 0.07(L-)	99%	98%	1.88 $\pm$ 0.21(LM)	99%	98%
D7	1.95 $\pm$ 0.40(LM-)	99%	98%	2.92 $\pm$ 0.48(M-)	99%	98%
D14	1.74 $\pm$ 0.23(LM)	99%	98%	2.38 $\pm$ 0.33(LM+)	99%	98%

Tabla 3. Índice de infección y similitud. Los organismos de *C. corteziensis* tuvieron una carga parasitaria ligera baja (L-) la cual incrementó después de la inoculación a ligera moderada baja (LM) y se mantuvo hasta finalizar el reto. Antes de la inoculación *C. virginica* tuvo una carga ligera moderada (LM), después de la inyección incremento a Moderada baja (M-) hasta alcanzar después de los 14 días a ligera moderada alta (LM+). El porcentaje de similitud con respecto a la variante texana (Genbank AF497479). La cobertura en todos los casos fue del 96 al 100%.

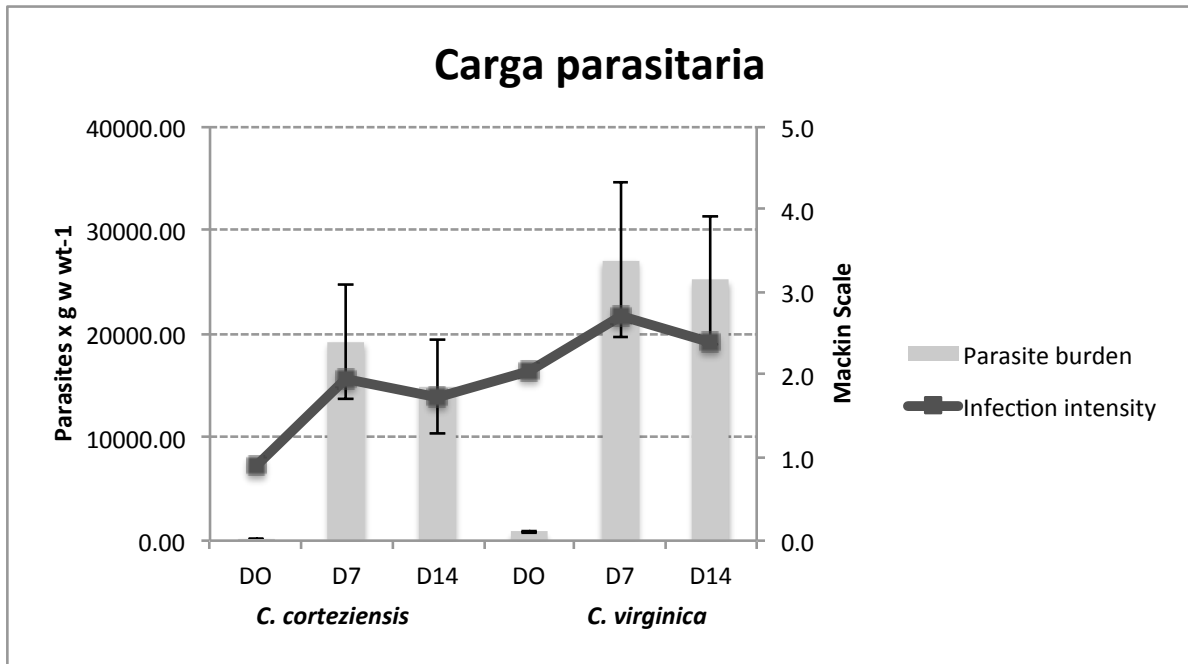


Figura 11. Índice de infección de *P. marinus*. La carga parasitaria expresada en número de *P. marinus* por gramo de peso húmedo (p.gph) e índice de infección (Escala de Mackin). Después de 7 días post-infección muestra un incremento de 1.05 y 1.08 unidades en *C. corteziensis* y *C. virginica* respectivamente posterior a la inoculación. Después de 14 días la carga parasitaria se redujo 0.21 unidades para *C. corteziensis* y 0.54 Para *C. virginica*.

*Diagnóstico molecular (PCR punto final y PCR cuantitativo).* Todos los ostiones del experimento se diagnosticaron para *P. marinus* mediante PCR. Todos presentaron un amplicón de 304 pb esperado para la región NTS de *P. marinus*, por tanto la prevalencia fue de 100%. Visualmente se observa en el gel de agarosa una bandas mas intensas en D7 y D14 de ambas especies con respecto a D0 de acuerdo a la figura 12. Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados obteniendo un porcentaje de similitud 98% de la secuencia NTS de *P. marinus* con respecto a la cepa de Texas (Genbank AF497479) y 99% de similitud de la región ITS para la misma cepa, estos resultados fueron similares tanto en *C. corteziensis* como en *C. virginica*. Asimismo las muestras del experimento fueron usadas para determinar la carga parasitaria mediante el equipo de PCR en tiempo real en el cual se

observó un patrón de hasta 3.2 veces de magnitud mayor que el control durante el D7 en *C. corteziensis* mientras que en *C. virginica* fue de 2.2 veces en D7 con respecto a D0 (Figura 13).

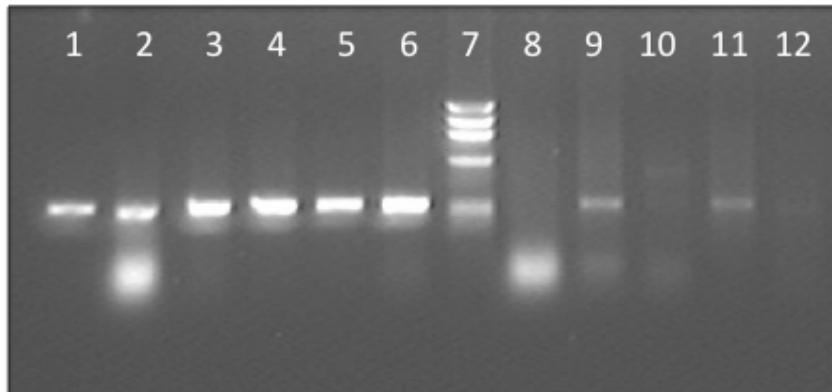


Figura 12. Diagnóstico por PCR. Utilizando los oligos NTS (304pb) se detectó la presencia de *P. marinus* en muestras experimentales. Carril 1: CC D7. Carril 2: CC D14. Carril 3: CV D7. Carril 4: CV D14. Carril 5: Control positivo silvestre. Carril 5: Control positivo plasmido. Carril 7: Marcador de peso molecular  $\phi$ X174 Promega. Carril 8: Control negativo. Carril 9: CV D0. Carril 10: CC D0. Carril 11: CV D0 replica. Carril 12: CC D0 replica.

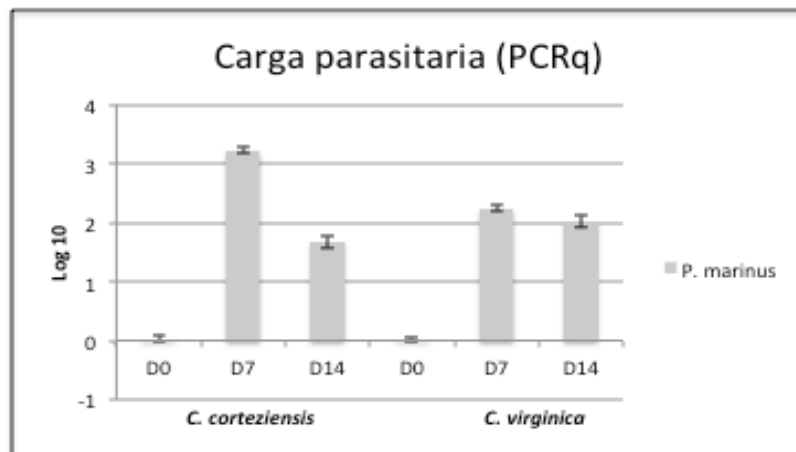


Figura 13. Carga parasitaria estimada por PCR en tiempo real. Ambas especies presentan un considerable incremento con respecto a los organismos control alcanzado hasta 3.2 veces para *C. corteziensis* y 2.2 veces para *C. virginica*. En ambas especies durante el D14 hubo una reducción de la carga parasitaria.



### Objetivo 3. Diagnóstico histopatológico de organismos experimentales.

*Descripción histológica e hibridación in situ.* Mediante estas herramientas se confirmó la presencia de *P. marinus* en los tejidos de todas las ostras. El análisis histológico reveló los distintos grados de infección. Se observaron fases de infección ligera o “1” durante D0 en *C. corteziensis*, sin embargo para *C. virginica* se observaron parásitos en el epitelio digestivo “1” así como infiltración hemocítica típica de fase “2”. D7 y D14 presentaron en general una mayor infiltración invasiva de hemocitos y parásitos diseminados en todo el tejido conectivo que rodea el epitelio de la glándula digestiva del cual fue mayor en *C. virginica* en comparación con *C. corteziensis* (Ver tabla 4 y figura 14). Ensayos de hibridación in situ detectaron la presencia del parásito principalmente en glándula digestiva y en menor número de branquias y manto de todos los organismos (Figura 15).

Tiempo	Especie	Nivel de infección
D0	Cc	1
D7	Cc	2
D14	Cc	2
D0	Cv	1/2
D7	Cv	2/3
D14	Cv	2/3

Tabla 4. Diagnóstico histopatológico. Días de infección y nivel de infección promedio. *C. corteziensis* alcanzó un máximo de nivel de infección (moderado) mientras que *C. virginica* en algunos individuos el nivel 3 (infección severa).

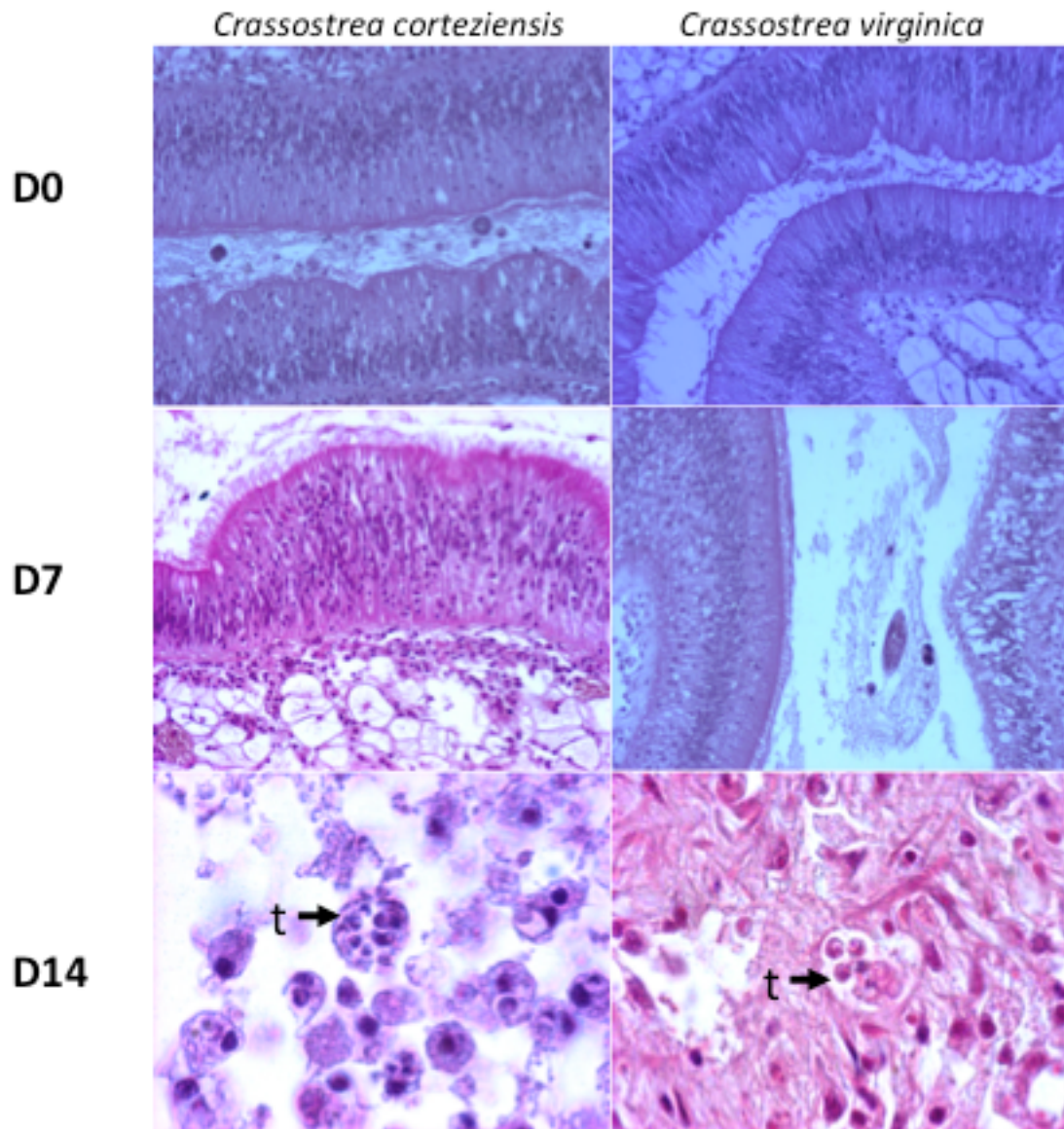


Figura 14. Imágenes histológicas. El diagnóstico histológico reveló que *P. marinus* estaba presente en la glándula y epitelio digestivo de ambas especies de ostiones durante D7 y D14. En estas etapas es visible la presencia hemocítica como consecuencia de la inoculación del parásito respecto a D0.

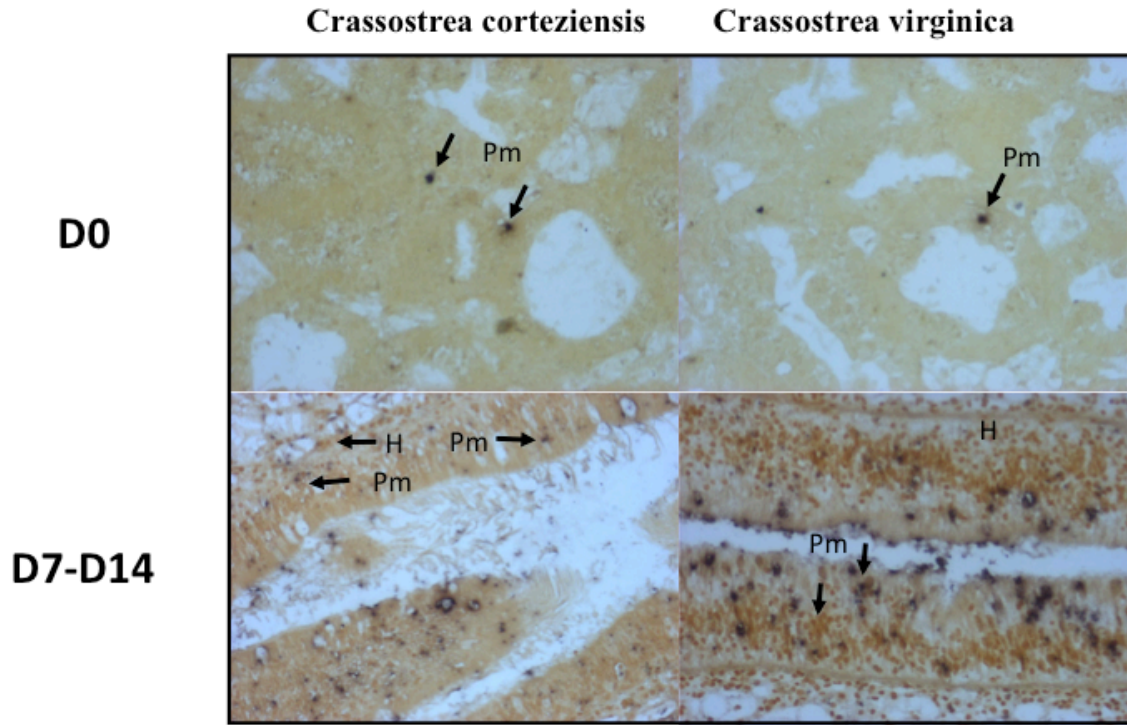


Figura 15. Hibridación *in situ*. Se observa el incremento de *P. marinus* post infección (D7-D14) así como abundante presencia hemocítica. Esta técnica evidencia que glándula digestiva fue el tejido mayormente infectado por los parásitos.

**Objetivo 4. Aislar y validar genes relacionados a respuesta inmune, actividad antioxidante y apoptosis.**

*Extracción de ARN.* La extracción de ARN se realizó exitosamente obteniendo concentraciones máximas de hasta 4ug/ul y mínimas de 0.8ug/ul. Aproximadamente 70% de las muestras presentaron una muy pobre o nula banda de la subunidad ribosomal 28S debido al efecto “hidden break” característico de invertebrados (Figura 16). *Síntesis de ADN complementario.* Se realizó síntesis de ADN complementario con oligo (dT) de 18 pb y hexámeros al azar ambos fueron validados con el gen de referencia B-actina y 28S ribosomal (Figura 17).

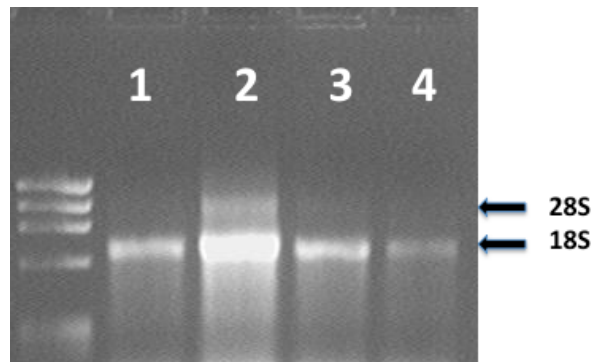


Figura 16. Extracción de ARN. 1: ARN total *C. corteziensis* D7. 2: ARN total *C. corteziensis* D14. 3: ARN total *C. virginica* D7. 4: ARN total *C. virginica* D14.

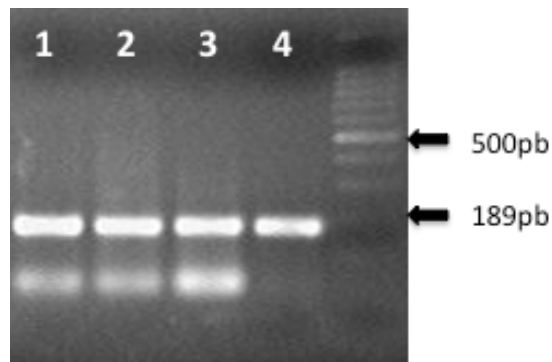


Figura 17. Validación de la retrotranscripción usando el oligo 28Sq. 1: ADNc *C. corteziensis* D7. 2: ADNc *C. corteziensis* D14. 3: ADNc *C. virginica* D7. 4: ADNc *C. virginica* D14.

*Evaluación de genes de interés.* Se aislaron los genes de interés que correspondían a los procesos de respuesta inmune, antioxidante y apoptosis. Todos fueron aislados de *C. corteziensis* y probados en ambas especies de ostiones. El análisis de las secuencias presentaron las siguientes similitudes (Tabla 5).

Gen	Proceso	Especie/Acceso Genbank	% Similitud	% Cobertura	Valor E
<b>SPI-1</b>	Inmune	C. Virginica (DQ092546)	99	83	9e-58
<b>SPI-2</b>	Inmune	C. Virginica (HQ425705)	89	100	8e-31
<b>NOS</b>	Inmune	C. Virginica (GQ844865)	88	99	2e-141
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Inmune	C. Gigas (EF157940)	96	100	1e-110
<b>HSP70</b>	Inmune	C. Gigas (AJ313882)	95	100	1e-65
<b>SOD Cu/Zn</b>	Antioxidante	C. Virginica (AB269930)	87	81	1e-73
<b>Casp 2</b>	Apoptosis	C. Gigas (HD425705)	90	100	4e-45
<b>IAP</b>	Apoptosis	C. Gigas (HQ425701)	93	100	0.0

Tabla 5. Genes relacionados a la respuesta inmune. Lista de genes que se lograron aislar a partir de *C. corteziensis* las cuales representan los 3 procesos involucrados en la defensa del ostión ante el parásito. Las secuencias tuvieron una alta similitud con especies del genero *Crassostrea* en un porcentaje de 87% y un máximo de 99%.

*Genes de referencia.* Tres genes de referencia se amplificaron exitosamente y las secuencias obtenidas tuvieron una alta similitud a *C. virginica* y *C. ariakensis*. Los resultados de similitud se expresaron en porcentaje como se muestra en la tabla 6.

<b>Gen de referencia</b>	<b>Especie/ Acceso Genbank</b>	<b>% Similitud</b>	<b>% Cobertura</b>	<b>Valor E</b>
<b>EF1-<math>\alpha</math></b>	C. Virginica (AB122066)	98	100	1e-117
<b>28S ribosomal</b>	C. Virginica (AY145400 )	98	100	4e-77
<b>B- actina</b>	C. ariakensis (EU234531)	99	100	1e-110

Tabla 6. Lista de genes de referencia validados para los organismos de estudio. Estos genes fueron utilizados como control interno durante el procesamiento de muestras y como gen de referencia durante la cuantificación por PCR cuantitativo. En todos los casos el porcentaje de similitud fue cercano al 100% a especies del genero *Crassostrea*.

**Objetivo 5. Validar genes seleccionados que se expresan de manera diferencial durante el proceso de infección.**

*Evaluación de la expresión génica por PCR cuantitativo.*

*Genes de referencia* (Figura 18). El fragmento de 28S ribosomal presentó la mejor eficiencia de amplificación (98%) en todos los tejidos y en todas las condiciones de ambas especies. Factor de elongación alfa obtuvo el segundo mayor porcentaje (92%) y B-actina no alcanzó 90% de eficiencia de amplificación. De acuerdo al algoritmo GeNorm el gen 28S Ribosomal fue el mas estable, seguido de EF1- $\alpha$  y  $\beta$ -actina (Figura 18).

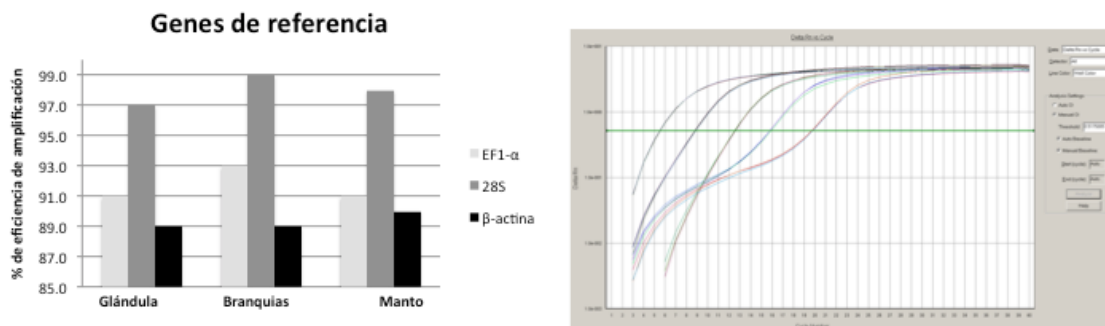


Figura 18. Evaluación de los genes de referencia. 28S ribosomal se comportó más estable en todos los tejidos y en todas las condiciones. B-actina fue el menos estable con una eficiencia de amplificación menos al 90%.

Inhibidores de serin Proteasa. Diferencias significativas fueron encontradas en todos los tejidos y ambas especies, excepto manto. La mayor diferencia se localizó en D7 de ambas especies. Glándula digestiva fue el tejido donde mayor actividad inhibitoria se encontró, alcanzando para el gen SPI-1 3.4 magnitudes de expresión en D7 mientras que SPI-2 fue de 2.9 veces con respecto a los organismos control en *C. corteziensis*. El ostión del este *C. virginica*, el cual alcanzó para SPI-1 aproximadamente 3.1 veces mayor expresión que el control mientras que en SPI-2 se estimó 2.2 magnitudes sobre D0 de la misma especie de

acuerdo a la figura 20. Los tejidos con menor actividad inhibitoria de proteasas de serina fueron branquias y manto los cuales no alcanzaron las 2 magnitudes de expresión génica respecto al control en ambas especies. Diferencias significativas se encontraron entre especies al comparar glándula digestiva y entre los días 7 y 14 post-infección .

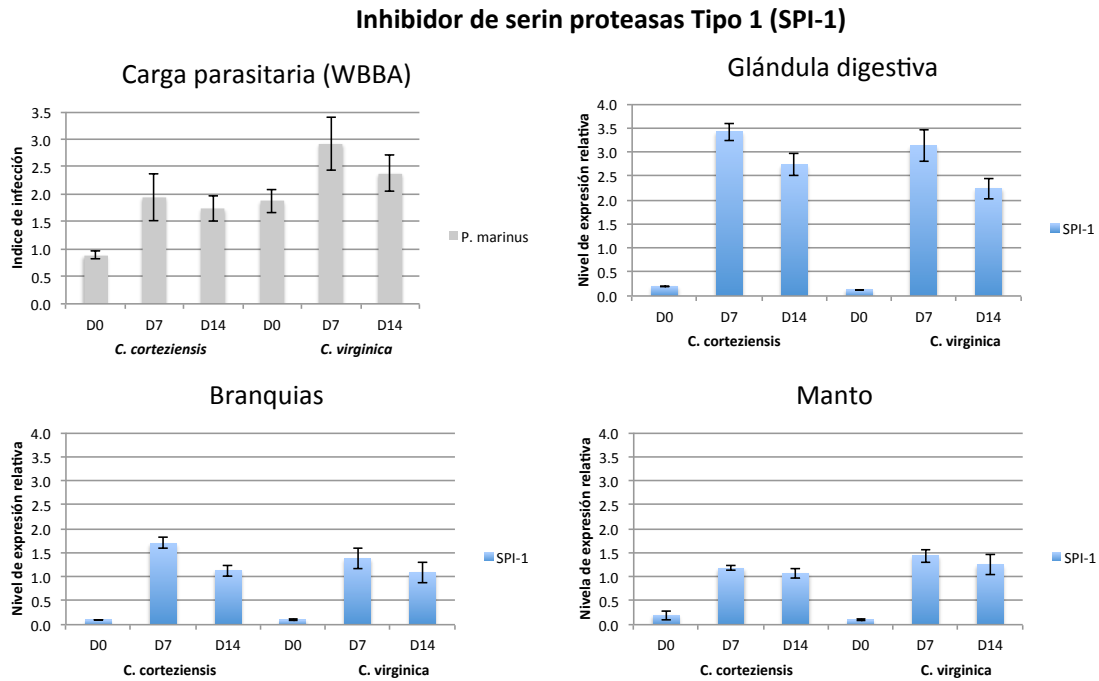


Figura 19 . Niveles de expresión relativa del inhibidor de serin proteasas I (SPI-1) de *C. corteziensis* y *C. virginica* a los 7 (D7) y 14 (D14) días post-infección. Diferencias significativas entre especies principalmente en glándula digestiva. El grafico superior izquierdo muestra el índice de infección estimado por conteo de parásitos.



## Inhibidor de serin proteasas Tipo 2 (SPI-2)

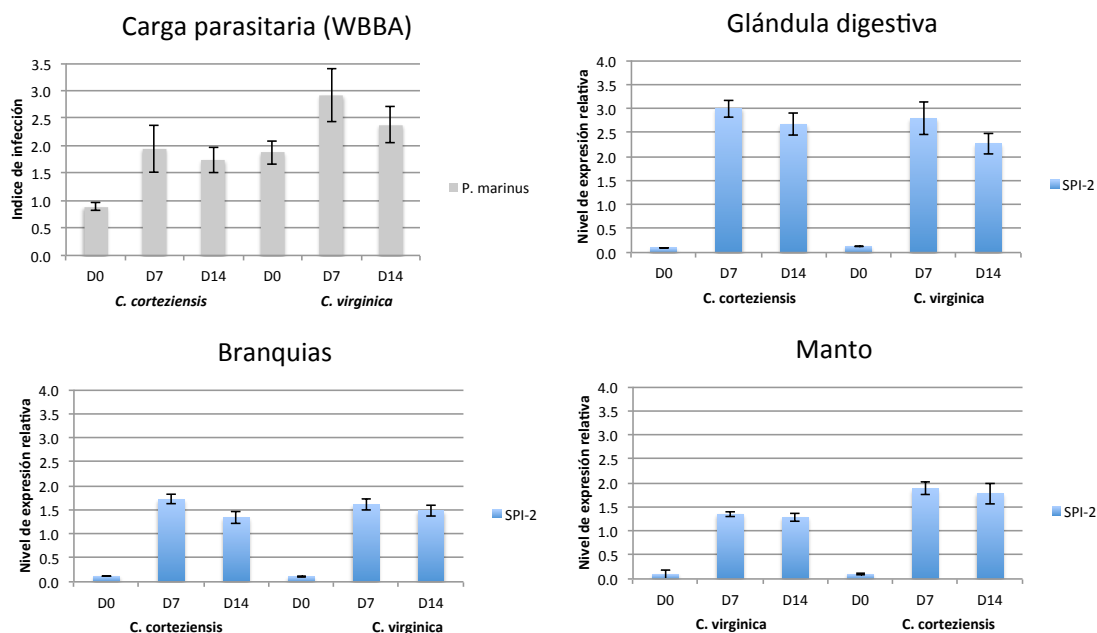


Figura 20 . Niveles de expresión relativa del inhibidor de serin proteasas (SPI-2) de *C. corteziensis* y *C. virginica* a los 7 (D7) y 14 (D14) días post-infección. El grafico superior izquierdo muestra el índice de infección estimado por conteo de parásitos.

Oxido nítrico sintasa. NOS presentó un significativo incremento de expresión por efecto de la inoculación en D7 de ambas especies respecto al control. Diferencias significativas se encontraron en D14 con respecto a D7 en ambas especies y tejidos excepto manto de acuerdo a la figura 21. Los tejidos donde NOS se expresó con mayor intensidad fue en glándula digestiva, branquias y manto (en este orden). Al comparar las especies *C. Corteziensis* la expresión fue superior en glándula digestiva (D7=3.0 y D14=3.5 folds), mientras que *C. virginica* alcanzó alrededor de 2.0 magnitudes de expresión respecto al control D0. Un patrón similar fue observado en branquias. No se encontraron diferencias significativas al comparar manto entre ambas especies.

## Oxido nítrico sintasa (NOS)

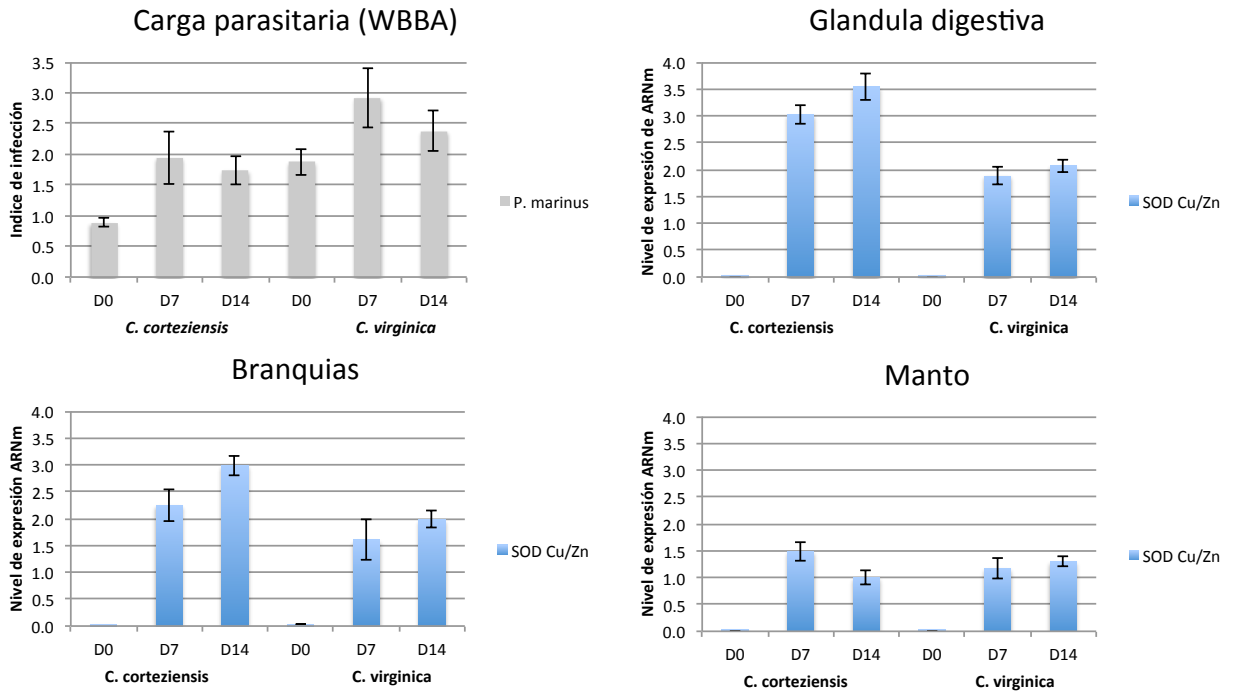


Figura 21 . Niveles de expresión relativa del ARNm de oxido nítrico sintasa (NOS) de *C. corteziensis* y *C. virginica* a los 7 (D7) y 14 (D14) días post-infección. Diferencias significativas entre especies en glándula digestiva y branquias. El grafico superior izquierdo muestra el índice de infección estimado por conteo de parásitos.

Factor de necrosis tumoral alfa (TNF-  $\alpha$ ). Glándula digestiva en ambas especies presento un nivel de expresión superior al resto de los tejidos. De acuerdo a la figura 22, la mayor expresión se observó en D7 la cual fue de 8 magnitudes con respecto a D0 en *C. corteziensis* mientras que *C. virginica* alcanzó 5.6 como máximo en D14. Branquias y manto de ambas especies presentaron significativas diferencias en D7 con respecto a D0 por efecto de la inoculación parasitaria, sin embargo, no hubo diferencias significativas entre D7 y D14 de ambas especies. Al comparar ambas especies, importantes diferencias fueron observadas en glándula digestiva en D7 donde *C. corteziensis* presento cambios significativos con respecto a *C. virginica*.

### Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )

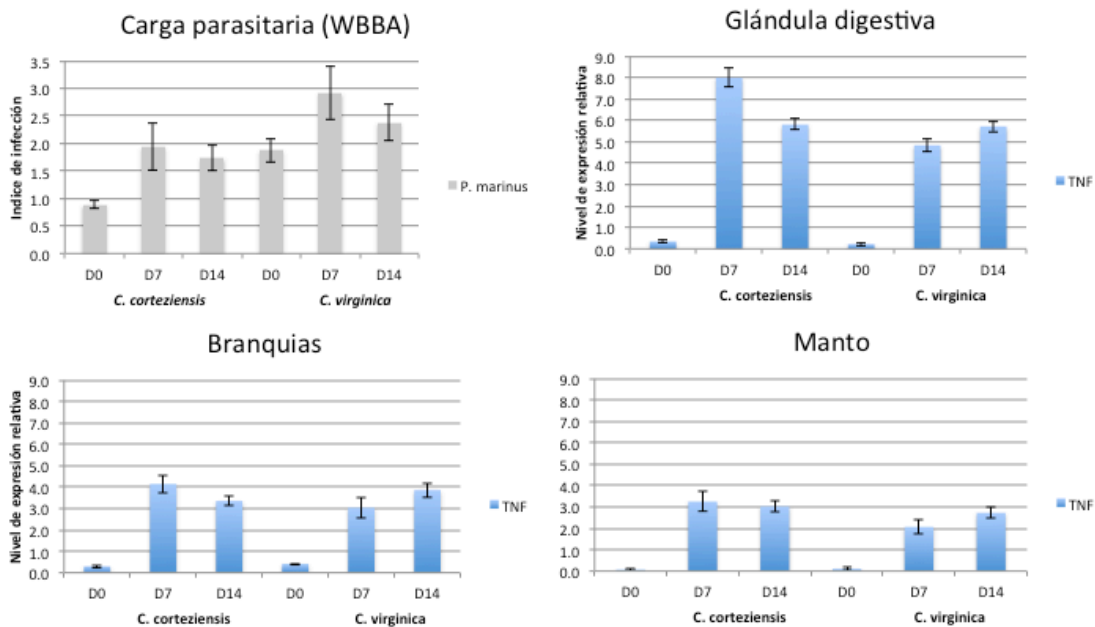


Figura 22 . Niveles de expresión relativa del factor de necrosis tumoral (TNF-  $\alpha$ ) de *C. corteziensis* y *C. virginica* 7 (D7) y 14 (D14) días post-infección. Glándula digestiva fue el tejido con mayor actividad mientras que branquias y manto presentaron menor actividad de este gen. El grafico superior izquierdo muestra el índice de infección estimado por conteo de parásitos.

Proteína de choque térmico 70 (HSP70). Este chaperon molecular alcanzó los niveles más altos de expresión relativa en glándula digestiva para *C. Cortezensis* como se observa en la figura 23. En su nivel máximo alcanzó 11.5 magnitudes respecto a D0 mientras que *C. virginica* en branquias tuvo 10.5 magnitudes de expresión que D14. Diferencias significativas entre las especies fueron encontradas en glándula digestiva donde *C. corteziensis* tuvo mayor cantidad de mensajeros, mientras que branquias y manto de *C. virginica* presentaron mayor actividad de este gen.

## Proteína de choque térmico 70 (HSP70)

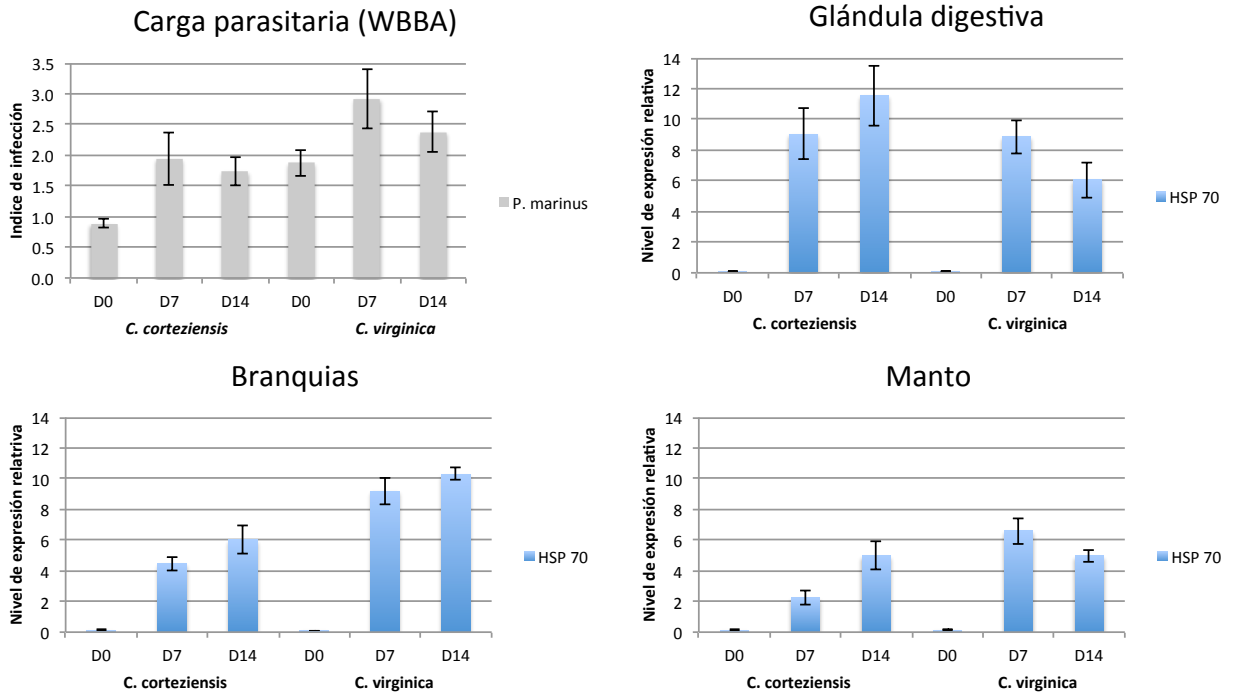


Figura 23. Niveles de expresión relativa del ARNm de la proteína de choque térmico (HSP70) de *C. corteziensis* y *C. virginica* a los 7 (D7) y 14 (D14) días post-infección. El gráfico superior izquierdo muestra el índice de infección estimado por conteo de parásitos.

Caspasa 3. Este gen presentó un patrón de expresión basal de acuerdo a D0 donde no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos. Glándula digestiva tuvo mayor expresión alcanzando una magnitud de 1.8, siendo esta la más alta reportada para este gen (Figura 24). Las diferencias significativas no fueron estadísticamente demostradas ni entre especies ni en los tejidos.

### Caspasa 3 (Casp 3)

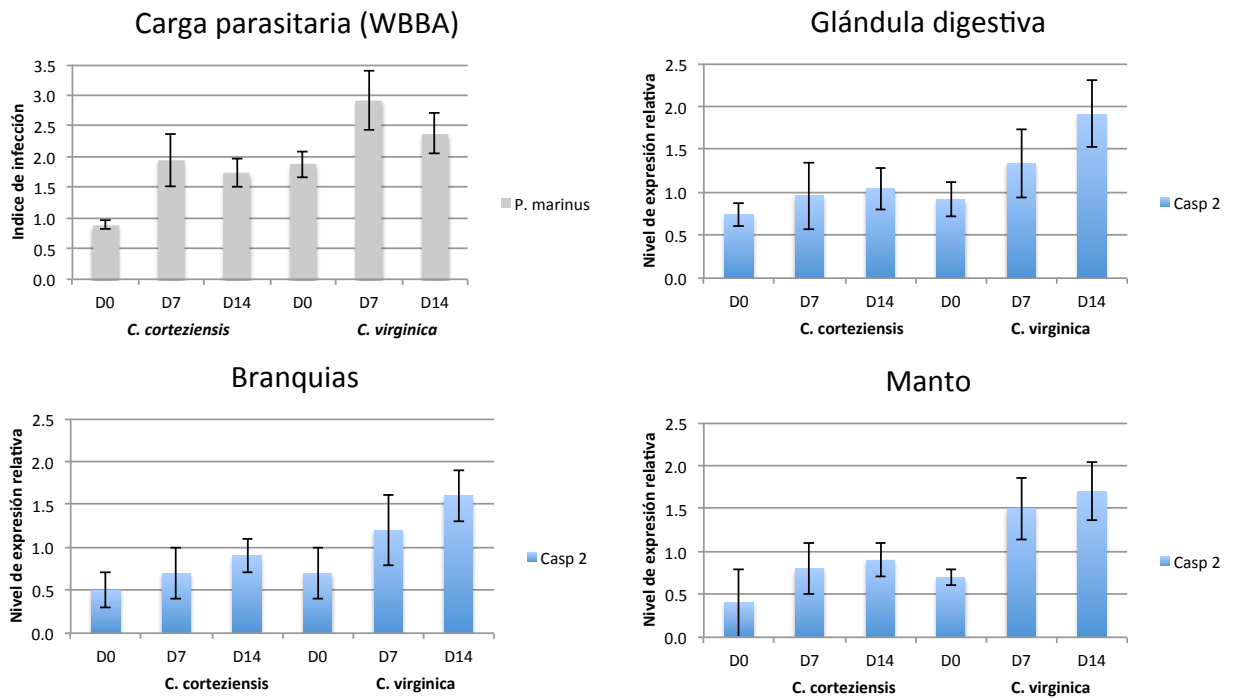


Figura 24. Niveles de expresión relativa del caspasa 3 (Casp-3) de *C. corteziensis* y *C. virginica* a los 7 (D7) y 14 (D14) días post-infección. En ningún caso se observaron diferencias significativas. El grafico superior izquierdo muestra el índice de infección estimado por conteo de parásitos.

Proteína inhibidora de la apoptosis. La expresión de este gen fue bajo en todos los tejidos y en todas las especies alcanzando su máximo de 1.1 magnitudes durante D14 en el manto de *C. corteziensis*. El tratamiento estadístico no detectó diferencias significativas entre los tejidos y especies al comparar D7 con D14 (Figura 25).

### Proteína inhibidora de la apoptosis (IAP)

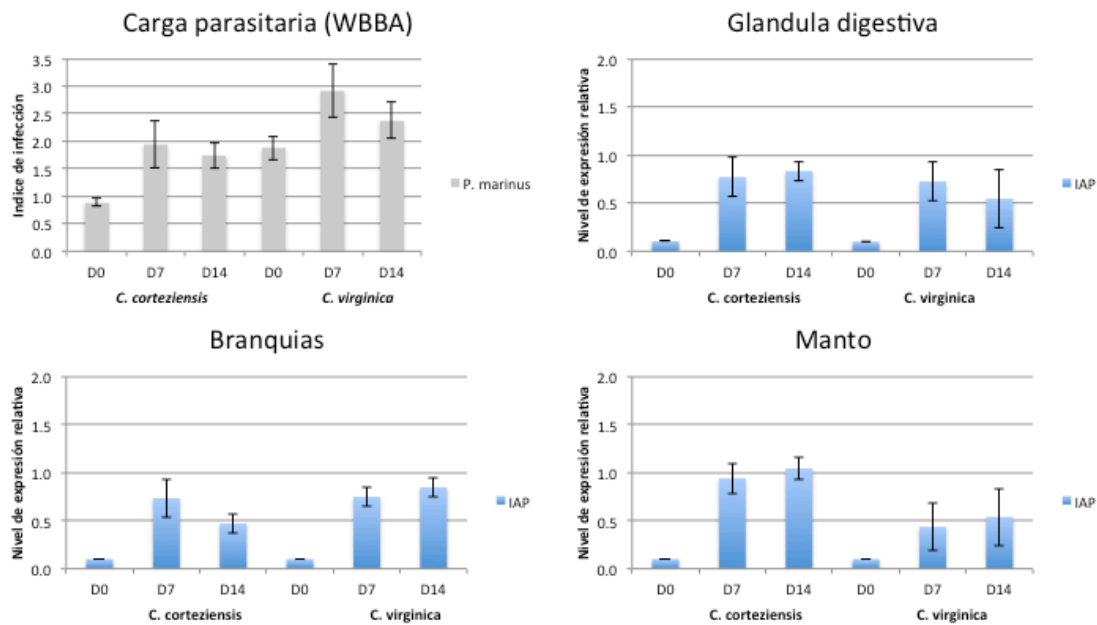


Figura 25. Niveles de expresión relativa del inhibidor de apoptosis (IAP) de *C. corteziensis* y *C. virginica* a los 7 (D7) y 14 (D14) días post-infección. No se encontraron diferencias significativas. El grafico superior izquierdo muestra el índice de infección estimado por conteo de parásitos.

### Superóxido dismutasa (SOD Cu/Zn)

La actividad de superóxido dismutasa con cofactor cobre/zinc (SOD Cu/Zn) tuvo diferencias significativas entre las especies y entre los tejidos, excepto entre glándula digestiva y branquias, los cuales alcanzaron los mayores niveles de expresión relativa por arriba de 3.0 en *C. corteziensis* mientras que *C. virginica* apenas alcanzó 2.0 según se observó en la figura 26. Una caída significativa de la expresión se observó durante D7 y D14 en la glándula digestiva de *C. corteziensis*. Este decremento de la expresión del ARNm se observó en todos los tejidos y todas las especies sin presentar diferencias significativas, excepto en glándula digestiva de *C. corteziensis* donde estadísticamente se demostró tal diferencia.

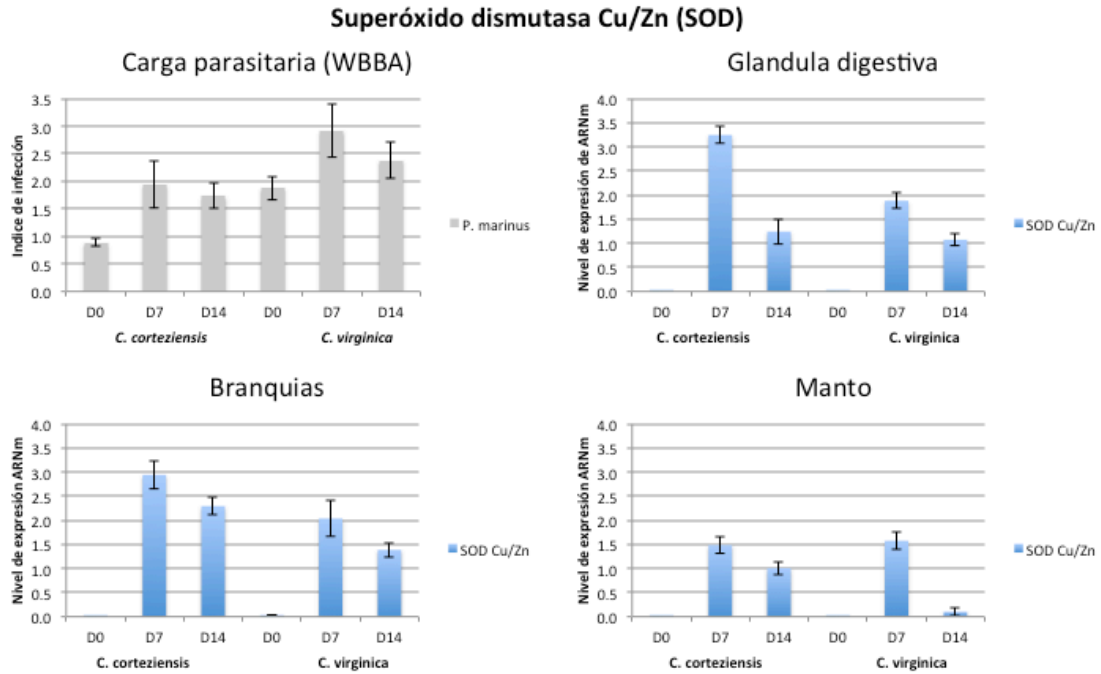


Figura 26. Niveles de expresión relativa de superóxido dismutasa (SOD Cu/Zn) de *C. corteziensis* y *C. virginica* a los 7 (D7) y 14 (D14) días post-infección. *Glandula digestiva* y branquias de *C. corteziensis* tuvieron diferencias significativas respecto a *C. virginica* al estimar el decremento en D7 y D14. El grafico superior izquierdo muestra el índice de infección estimado por conteo de parásitos.

## DISCUSIÓN

El presente estudio evaluó genes relacionados a la respuesta inmune de 2 especies del genero *Crassostrea* infectados experimentalmente con el parásito patógeno *P. marinus*. Los resultados se discuten a continuación.

### **Objetivo 1: Establecer un modelo de infección experimental de *C.cortezensis* y**

#### ***C. virginica* por el patógeno *P. marinus***

##### *Cultivo del parásito.*

Diversos grupos de investigadores han establecido formulaciones para el cultivo *in vitro* de *P. marinus* algunos más exitosos que otros (Gauthier and Vasta 1995; La Peyre, *et al.*, 1993). El medio de cultivo DME:Ham's F-12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Mezcla de nutrientes F12) es uno de los mas empleados. Diversas proporciones han sido empleadas siendo una de las mas exitosas la proporción 1:2 (DME:Ham's F-12) desarrollado por Gauthier y Vasta en 1995. El principal objetivo de estos medios es el alargamiento del protozoario mediante la estimulación por nutrientes y la generación (división) de trofozoitos multinucleados (tomontes) seguido por la liberación de células hijas (Dungan y Hamilton 1995; La Peyre 1996). En el presente trabajo se utilizó una formulación similar a la propuesta por Gauthier y Vasta (1995) con modificaciones. La reducción del suplemento suero fetal bovino de 20% a 2% (FBS) y la inclusión de lípido concentrado tuvo efectos positivos en el cultivo como lo sugiere Hughes *et al.*, 2010, pues se observó un incremento en el número de trofozoitos y lo cual requirió realizar subcultivos a fin de evitar la saturación de parásitos en el medio. La temperatura del cultivo (28°C) favorece la proliferación de bacterias, por lo que la incorporación de una fuerte carga de antibióticos y



antifúngicos redujo drásticamente la contaminación del cultivo. De acuerdo a Casas y colaboradores (2008), 400,000U de penicilina G, 400mg de sulfato de estreptomicina diluidos en agua estéril inhibe el crecimiento bacteriano. Esta formulación fue empleada en este trabajo el cual permitió la obtención de casi 30 millones de trofozoitos viables para ser utilizados en el reto. Una importante aportación al éxito del reto fue la activación del parásito el cual no se encuentra documentado en los artículos científicos. Este procedimiento consiste que previo al reto una vez que el medio DME: Ham's F12 se ha eliminado, los parásitos deben ser colocados en matraces con agua de mar artificial y estéril durante una semana (Gómez-Chiarri, com. per.). Durante este periodo de tiempo los parásitos dejan su estado caracterizado por abundancia de nutrientes para entrar en una etapa de mayor actividad posiblemente por la búsqueda de sitios que provean sustento por lo que se considera que los parásitos están en condiciones para infectar a los ostiones.

#### *Animales y su mantenimiento.*

Los organismos fueron mantenidos en 4 tinas independientes como se mencionó en la metodología. Durante dos semanas previas al reto fueron mantenidos las tinas con aeración permanente con limpieza del fondo de los estanques diaria. Asimismo se cepillaron las conchas de los ostiones y se revisaron visualmente a fin de encontrar ectoparásitos, síntomas de enfermedad u organismos muertos. La alimentación fue basada de acuerdo a estudios previos (Muñoz *et al.*, 2003; Morsey *et al.*, 2005). La dieta de mantenimiento fue exitosa debido a la mezcla de microalgas que contenía y la cantidad provista en cada dosis. Las microalgas como *Nannochloropsis* y *Tetraselmis* las cuales formaron parte de la mezcla han sido previamente usadas (Goedken *et al.*, 2005). El criterio mas importante adicional al valor nutricional es el tamaño de la partícula, la cual requiere de 2 a 15  $\mu\text{m}$  (Hughes *et al.*,

2010). Gracias a su tolerancia a salinidad y temperatura de ambas especies, durante el experimento los ostiones se mantuvieron en condiciones ideales las cuales fueron alrededor de 28 °C y 30 ppm de acuerdo a lo sugerido por Chavez-Villalba *et al.*, 2005.

*Diagnóstico de P. marinus en ostiones previo al reto e Identificación molecular de la variante de P. marinus*

El diagnóstico previo al reto indicó que los ostiones colectados en Sinaloa y Tabasco presentaron 100% por lo que el reto se inicio con ostiones previamente infectados (la prevalencia se discutirá posteriormente). De acuerdo a la escala de Mackin los ostiones antes del reto presentaban infección ligera en *C. corteziensis* y ligera-moderada para *C. virginica*, no fue posible encontrar organismos libres del patógeno por lo que fue necesario realizar la cuantificación de parásitos mediante WBBA con el propósito de asegurar una re-infección. El diagnóstico previo también incluyó detección molecular para confirmar la presencia del parasito usando la región NTS de la porción ribosomal de *P. marinus* (Robledo *et al.*, 1999). Los oligonucleótidos que amplifican la porción NTS son ampliamente utilizados por laboratorios de diagnóstico alrededor del mundo, debido a que son recomendados por la Organización mundial de salud animal (OIE, 2006). Igualmente se hizo la amplificación de la porción ribosomal ITS, recomendada para análisis filogenético y determinar cepas o variantes (Park *et al.*, 2006). Este oligo permitió comparar el parásito aislado en el noroeste de México y compararlo con la variante Texana (AF497479), la cual se afirmó que fue dispersada en la costa del pacifico debido a la movilidad de ostiones del Golfo de México al estado de Nayarit con fines comerciales (Cáceres-Martínez *et al.*, 2008). Nuestros resultados con ambos oligos coinciden con lo reportado por Cáceres-Martínez *et al.*, (2008) y Escobedo-Fregoso *et al.*, (2013) quienes reportaron 96% de similitud en *C.*

*corteziensis* mientras que para *C. virginica* fue del 98% al compararse con el aislado de Texas.

La región ITS ha sido ampliamente reportada como marcadores para distinguir variaciones entre especies (Reece *et al.*, 2008). Un estudio realizado a lo largo de la costa este de EUA indicó que utilizando la porción del ITS es posible la identificación de las variantes del patógeno (Brown *et al.*, 2004). Aunque el propósito de este trabajo no fue realizar un análisis filogenético comparativo entre *P. marinus* aislado de *C. corteziensis* y *C. virginica*, la secuenciación del ITS fue importante para confirmar lo reportado por Cáceres-Martínez *et al.*, (2008) y Escobedo-Fregoso *et al.*, (2013). Esta última, usó organismos de la misma región Nayarit reportando 30 sitios polimórficos para NTS en un fragmento de 1165 pb mientras que para ITS 23 bases en una longitud de 485 pb.

#### *Infección experimental.*

La carga parasitaria usada en este trabajo es considerada intermedia ( $1 \times 10^6$  parásitos/ostión) de acuerdo a Shimokawa (2010). La concentración mencionada y el método de inoculación han sido utilizados exitosamente en trabajos previos realizados por Wang *et al.*, 2010; He *et al.*, 2012. Wang y colaboradores inocularon  $1 \times 10^6$  parásitos de *P. marinus* a fin de evaluar la respuesta inmune mediante un microarreglo de ADNc de *C. virginica*, mientras que He y su equipo realizaron infecciones similares con el propósito de evaluar mutaciones sobre ARNm de inhibidores de serine proteasas en ostiones *C. virginica*. Hace 30 años, los ostiones eran retados mediante inmersión en ambientes artificiales contaminados con *P. marinus* (Meyers *et al.*, 1991; Barber & Mann, 1994) o bien, mediante alimentación con microalgas conteniendo al parásito (Bushek *et al.*, 1997). Romestand *et al.*, (2001) utilizó el método de inoculación por inyección mediante perforación de la concha, el cual fue

realizado exitosamente. Posteriormente Chintala *et al.*, (2002); Muñoz *et al.*, (2003) Tanguy *et al.*, (2004); entre otros, realizaron infecciones perforando la línea de unión de las valvas por el cual se inoculaban diversas concentraciones de *P. marinus* a fin de provocar la infección experimentalmente. Diferentes concentraciones han sido empleadas variando con el propósito del ensayo, Wan *et al.*, (2010) inyectó  $1.11 \times 10^6$  parásitos los cuales mantuvo durante 30 días a fin de evaluar a través de un microarreglo de 21,000 genes involucrados en los procesos de respuesta inmune, reconocimiento del patógeno actividad antioxidante y apoptosis. La Peyre y colaboradores en 2010 usaron  $4 \times 10^5$  parásitos para medir la actividad de inhibidores de serina proteasa en organismos de *C. virginica* silvestres y cultivados en laboratorio. Villamil *et al.*, (2007) colocó  $5 \times 10^6$  parásitos con el propósito de evaluar la actividad de enzimas pro-inflamatorias como óxido nítrico (NO). Tanguy y su equipo en 2004 inocularon  $1 \times 10^6$  trofozoitos de *P. marinus* en dos especies de ostión, una susceptible (*C. virginica*) y una resistente (*C. gigas*) con el cual usando la herramienta de hibridación substractiva caracterizaron genes involucrados en la respuesta inmune.

En el presente trabajo, la cantidad de parásitos utilizados fue adecuada, pues fue posible inocular y mantener los parásitos dentro del ostión lo cual fue verificable al comparar D0 con respecto a D7 mediante el conteo de parásitos (WBBA). PCR en tiempo real e histología, los resultados demuestran que el organismo fue verdaderamente infectado por *P. marinus* y que la respuesta inmune (infiltración hemocitaria) fue activada en ambas especies de ostiones.

**Objetivo 2: Validar el éxito de la infección experimental mediante métodos diagnósticos.**

*Cuantificación de la carga parasitaria e índice de infección.*

Como consecuencia de la inoculación de trofozoitos de *P. marinus*, se observó un incremento importante en la carga parasitaria y en consecuencia de el índice de infección. Estudios previos han demostrado que la inyección del parásito en la cavidad de la concha es más efectiva que otros métodos, los cuales se han mencionado anteriormente (Romestand *et al.*, 2001). Nuestros resultados demostraron que la infección se realizó exitosamente pues hubo un considerable incremento entre D0 y D7 de ambas especies de acuerdo a los resultados de WBBA lo a cual fue confirmado por PCR e histología. Las herramientas diagnósticas, WBBA e índice de infección de Mackin son ampliamente usadas para estimar el nivel de infección por *P. marinus*. Wang y colaboradores en 2010 infectaron ostiones libres del patógeno (índice 0) con  $1.11 \times 10^5$  p.gph obteniendo después de 30 días índices de 0 a 2.0 (ligero) hasta fuertemente infectado (3.67 a 4.67). Muñoz *et al.*, (2003) inoculó  $5 \times 10^5$  parásitos a ostiones de *C. virginica* diagnosticados como libres de *P. marinus* llevando a los ostiones de un índice de infección de 0 a 2.2 de acuerdo a la estala de Mackin. Chintala *et al.*, (2002) infectó ostiones *C. virginica* con  $8 \times 10^6$  parásitos y estimó la carga parasitaria en heces, las cuales representaron solo el 5% de la cantidad inicial inoculada. Estas técnicas de infección experimental pueden ser validadas adicionalmente por PCR de punto final o bien PCR en tiempo real. Pese a que las técnicas moleculares son ampliamente empleadas para el diagnóstico de *P. marinus*, WBBA y el alargamiento de trofozoitos en medio tioglicolato para la estimación del índice de infección de Mackin son consideradas el estándar de oro (OIE, 2006).

*Diagnostico molecular (PCR punto final y PCR cuantitativo).*

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR, es una prueba confirmatoria de la presencia de *P. marinus*. OIE estableció el uso de oligonucleótidos que amplifican la región NTS descritos por Marsh *et al.*, (1995) y posteriormente Ragone-Calvo *et al.*, (2003) para este propósito. Estos cebadores son usados ampliamente en el diagnostico del parásito sin embargo, no son útiles si se desea identificar variantes dentro de la misma especie. Cáceres-Martínez y colaboradores reportaron la presencia de *P. marinus* en *C. corteziensis* en el estado de Nayarit (2008), Enríquez-Espinoza en *C. gigas* del alto Golfo de California (2010) y Cáceres-Martínez en *Saccostrea palmula* en Sinaloa (2012). En todos los casos los oligonucleótidos NTS fueron empleados. Estos mismos oligonucleótidos han sido reportado en trabajos previamente publicados en la especie *C. virginica* (Thompson, 2010; Robledo *et al.*, 2011). Huicab-Pech y colaboradores en 2012, realizaron una evaluación para estimar la variación estacional de *P. marinus* del sistema lagunar Carmen- Machona-Pajonal en Tabasco, México. La región NTS es útil para el diagnóstico de rutina el cual se complementa con las técnicas de alargamiento de trofozoitos como WBBA o una simple incubación en medio RFTM. Con ello es posible estimar la prevalencia en ostiones colectados. En nuestro estudio encontramos prevalencia del 100% en ambas especies. Otros estudios realizados en el noroeste de México han sido reportados, por ejemplo: Cáceres-Martínez en 2008 encontró que para las poblaciones de Nayarit las prevalencias fueron del 1 al 6% mientras que Escobedo-Fregoso *et al.*, (2013) reportó de 77 al 92% en las mismas lagunas costeras estudiadas por Cáceres-Martínez. Enríquez-Espinoza en 2010 anuncia una prevalencia de 100% para *C. gigas* en el estado de Sonora. En Sinaloa durante el 2012 Cáceres-Martínez encontró una prevalencia máxima de 20% en *S. palmula*. Por otro lado, la prevalencia en *C. virginica* del área de Tabasco en el Golfo de México fluctuó durante el

2010-2011 de 73.3, 90 y 100% en las temporadas de lluvia, viento y época seca respectivamente. La herramienta PCR en tiempo real no es muy empleada para la estimación de carga parasitaria pues WBBA es a decir de la propia OIE mas barata y con precisión aceptable. En el presente estudio, los resultados de PCR en tiempo real no correspondieron a lo estimado mediante WBBA, al menos en la tendencia que la carga parasitaria presentó. Esto es debido probablemente a que utilizó la química Sybr-green y no sonda taqman especifica ya que el propósito de usar esta herramienta era confirmar un patrón de infección a lo largo del experimento y no cuantificar a los parásitos. PCR en tiempo real posee algunas desventajas, el alto costo de las enzimas, la relativa laboriosidad del proceso ya que requiere triplicados por muestra, el uso del equipo y que el técnico debe tener experiencia en técnicas moleculares (Yarnall *et al.*, 2000). Adicionalmente, existe una gran cantidad de inhibidores de PCR en tejidos como glándula digestiva, recto, etc., así como ADN ambiental (Lesser, 1995), lo que representa un reto la preparación y la fiabilidad del resultado. Sin embargo, las ventajas de esta metodología incluye la excepcional sensibilidad usando pequeñas proporciones de tejido u hemolinfa y su capacidad de cuantificar el número de parásitos (Yarnall *et al.*, 2000). Si bien, la estimación de qPCR no correspondió en proporción a lo cuantificado mediante WBBA, trabajos como De Faveri *et al.*, (2009) encuentran similitud en la cuantificación de *P. marinus* con respecto a al conteo de hipnosporas por RFTM. De acuerdo a De Faveri, la sensibilidad del método fue 10 veces superior a RFTM y permitió detectar hasta 3 parásitos mientras que el método tradicional de incubación en tioglicolato no fue posible. Una desventaja del uso de qPCR para diagnóstico de *P. marinus* fue la necesidad de realizar corridas de curva estándar lo que incrementa el costo y el tiempo. De Faveri menciona que los inhibidores presentes en la muestra comprometen la eficiencia de las polimerasas por lo que se considera un problema que requiere solución. Un importante punto a favor del PCR en tiempo real sería la reproducibilidad ya que cualquiera de las técnicas que requieren incubación por RFTM carecen de esta característica.

### **Objetivo 3. Diagnóstico histopatológico de organismos experimentales.**

#### *Descripción histológica e hibridación in situ.*

El diagnóstico histológico es una importante herramienta para la detección de *P. marinus*, sin embargo carece de confiabilidad en cargas parasitarias bajas (Almeida *et al.*, 1999). Los daños histológico fueron consistentes con los reportados por Cáceres-Martínez y colaboradores (2008) en *C. corteziensis*. *P. marinus* fue observado en intestinos, glándula digestiva, manto y branquias, en algunos casos con actividad hemocítica. Trofozoitos uninucleados fueron observados mayormente durante D0. Los ostiones de *C. virginica* infectados con *P. marinus* presentaron daños más severos en la estructura tisular tal como lo describe Villalba *et al.*, (2004). Alteraciones en branquias y glándula digestiva asociadas a una fuerte infiltración masiva de hemocitos en tejido epitelial y conectivo coincide con lo descrito por Huicab-Pech *et al.*, (2012). Trofozoitos de tamaño superior a los 30  $\mu\text{m}$  de diámetro y tomontes (trofozoitos multinucleados) se localizaron en el intestino de ambas especies durante D7 y D14. (Villalba *et al.*, 2004).



#### **Objetivo 4. Selección, aislamiento y evaluación de genes relacionados a respuesta inmune, actividad antioxidante y apoptosis.**

Los métodos de extracción de ARN, síntesis de ADN y amplificación fueron similares a los empleados por Gutierrez-Rivera *et al.*, 2003. En la mayoría de los ARN extraídos no se observó durante la electroforesis la subunidad ribosomal 28S, lo cual a diferencia de indicar degradación se trata de un bien conocido evento reportado en invertebrados como ruptura oculta o “hidden break” (Winnebeck *et al.*, 2009). La ruptura oculta ocurre al desnaturalizar el ARN por temperatura, donde los puentes de hidrogeno se rompen liberando dos fragmentos de tamaño similar que ambos emigran estrechamente con 18S ARNr.

Un total de 18 genes seleccionados en base a literatura consultada fueron aislados. La mayoría de ellos han sido reportados para *C. virginica* y *C. arakensis* (Renault *et al.*, 2012; He *et al.*, 2012; La Peyre *et al.*, 2010; Kiss, 2010; Gestal *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2008; Encomio y Chu, 2007). Debido a que ninguno de ellos ha sido reportado para *C. corteziensis* no todos fue posible aislar. Un total de 11 genes de los 18 propuestos fueron aislados de *C. corteziensis* los cuales fueron secuenciados y amplificados en ambas especies de ostión. Los genes usados en este estudio han sido exitosamente analizados en trabajos previos que a continuación se describen.

SPI-1 y SPI-2 fueron tomados a partir de la secuencia reportada por La Peyre y colaboradores (2010) y Xue *et al.*, (2009) de *C. virginica*. La elección de estos genes se remonta al estudio donde Faisal y colaboradores reportaron incremento en la actividad de inhibidores de proteasas en ostiones de *C. virginica* y *C. gigas* en presencia de *P. marinus*, la medición de este evento fue considerado sustancial en este estudio, pues los inhibidores de proteasas incrementan su expresión en presencia del parásito. Este mismo patrón fue observado en nuestros resultados los cuales se discutirán a profundidad más adelante. Otra

evidencia de la importancia y elección de este gen es el estudio realizado por Romestand *et al.*, (2002), tras infectar experimentalmente a dos especies de ostión encontró *C. gigas* posee una mayor actividad inhibitoria que *C. virginica*, sugiriendo una posible resistencia de *C. gigas* a *P. marinus*. Recientemente, ensayos *in vitro* demostraron que los inhibidores de proteasas de serina aislados de *C. virginica* 1 y 2 (cvSI-1 y cvSI-2) suprimen fuertemente a perkinsina y subtisilina A, las principales proteasas extracelulares de *P. marinus* (Xue *et al.* 2009; La Peyre *et al.* 2010).

Oxido nítrico sintasa (NOS) y Factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), son genes que se eligieron debido a que estos están involucrados en la respuesta inmune. NOS produce oxido nítrico (NO) la cual es una molécula inmunoreguladora, mediante la conversión de L-arginina a L-citrulina y la intervención de la oxidación de NADPH. (Rivero, 2006). La forma inducible de NOS (iNOS) parece ser inducida por patógenos de acuerdo a Li *et al.*, (2012), debido a que participa activamente en la eliminación de los patógenos en el cual compuestos derivados de la oxidación tienen actividad antibacteriana, antiviral y antiparasitaria (Fang, 1997). Sin embargo, en infecciones intensas con *P. marinus* NOS parece ser evadida por el parásito. Villamil *et al.*, (2007) reporta una producción creciente de NO durante los primeros 14 días sin embargo no hay disminución en la carga parasitaria lo cual contrasta con los resultados de nuestro estudio en el cual NOS incrementa en D7 y D14 disminuyendo la carga parasitaria.

Por otro lado, TNF- $\alpha$  es un mediador pro-inflamatorio pues forma parte del grupo de citocinas que son activadas por la infección de patógenos (Beutler *et al.*, 2003). Yu y colaboradores en 2007 y 2012 demostraron que en *C. virginica* mediante retos con patógenos TNF- $\alpha$  incrementa su expresión debido al incremento del proceso infeccioso e

inflamación de los tejidos. Su expresión puede ser evaluada en diversos tejidos de moluscos excepto hemocitos donde la señal es baja (Yang *et al.*, 2011). Los resultados reportados en este trabajo muestran que hay un significativo incremento de TNF- $\alpha$  por efecto de la inoculación con posterior disminución durante D14. Park *et al.*, (2008), infectó ostiones de la especie *C. gigas* con una mezcla de bacterias del genero *Vibrio* obteniendo incremento de este gen a lo largo del tiempo alcanzando su máxima expresión a las 12 hrs post-infección, lo que sugiere una relación proporcional entre el gen y el patógeno.

La proteína de choque térmico (HSP70) fue elegida debido a que esta involucrada en diversos procesos incluyendo respuesta inmune (Wang *et al.*, 2013). Una evidencia de ello la presenta Chu y colaboradores (2005), quienes demuestran el papel protector celular por incremento de la expresión de HSP70 durante la infección con *P. marinus* en *C. virginica*. Nuestros resultados a diferencia de los reportados por Chu y colaboradores encontraron mayor expresión en D14 mientras que para ellos en D7, debido probablemente a que ellos usaron una dosis subletal del parásito mientras que en este trabajo se empleo una carga moderada.

Como se mencionó anteriormente, la infecciones de *P. marinus* están seguidas de proceso inflamatorios que se da a las horas o días después del contacto con el parásito (Guo *et al.*, 2008). La enzima supeóxido dismutasa (SOD) esta involucrada en la inflamación pues posee la capacidad de catalizar la dismutación de los radicales superóxido resultante de ROS (especies reactivas de oxígeno) a compuestos menos dañinos como oxígeno y peróxido de hidrogeno, los cuales son reducidos a agua mediante catalasa y glutatión peroxidasa (Lee *et al.*, 2013).

Caspasa 3 (Casp-3) es un importante activador de la apoptosis. Hughes *et al.*, 2010 reportó activación de Casp-3 en hemocitos infectados por *P. marinus in vitro*, obteniendo una importante expresión a los 45 minutos post-infección. Zhang *et al.*, (2011), evaluó el papel de la caspasa 3 tras infectar *C. gigas* con *Vibrio alginallorum* modulando la expresión de esta. Durante las primeras 24 horas, caspasa 3 registra su máxima expresión siendo la mayor a las 12 hrs post-inoculación. Kiss (2010) explica como la apoptosis es activada por Casp-3 en distintos eventos biológicos (ruta intrínseca y extrínseca).

Proteína inhibidora de apoptosis (IAP). El estudio más reciente (Zang *et al.*, 2014) demuestra el importante papel de esta proteína, debido a que la apoptosis es un mecanismo que opera negativamente contra el parásito. Durante su estudio demuestra que IAP posee un papel regulador muy activo en *C. virginica* el cual parece estar asociado a altas cargas parasitarias. Moreira en 2012, infectó almejas con *Vibrio alginoliticus* encontrando actividad de IAP en las primeras 24 hrs y permitiendo el inicio de la apoptosis posterior a este tiempo. IAP posee la capacidad de bloquear las caspasas efectoras (Casp-3) por lo que su evaluación en el presente trabajo fue muy valiosa.

Los genes de referencia seleccionados y aislados de *C. corteziensis* fueron igualmente empleados para *C. virginica* y han sido utilizados en diversos estudios. Du y colaboradores (2013), realizaron una validación de genes de referencia en *C. gigas* en los que incluían los 5 genes de referencia propuestos en este trabajo (28S, 18S, GAPDF, EF-1,  $\beta$ -Actina). Du usó el algoritmo GeNorm (Vandesompele, 2002) para evaluar la estabilidad. De acuerdo a sus resultados, los genes de referencia más estables fueron en el siguiente orden: 28S, 18S,  $\beta$ -

Actina, GAPDH y EF-1. Nuestros resultados coinciden con Du (2013), pues 28S fue el que mostró mayor estabilidad, sin embargo en nuestro estudio EF1 y  $\beta$ -Actina fueron mejores que 18S mencionado por Du. Otros trabajos han utilizado 28S como gen de referencia debido a su alta estabilidad. Tanguy *et al.*, (2004) utilizó 28S ribosomal como gen de referencia para validar la expresión de genes obtenidos por hibridación substractiva al infectar con *P. marinus* a ostiones *C. gigas* y *C. virginica*. La Peyre *et al.*, (2010) al evaluar la expresión de inhibidores de serin proteasa en ostiones de *C. virginica* infectados por *P. marinus*, utilizó 28S como gen de referencia.

## **Objetivo 5. Validación de genes seleccionados que se expresan de manera diferencial durante en el proceso de infección.**

### Inhibidores de serin Proteasa.

Los resultados obtenidos muestran que SPI-1 y SPI-2 en ambas especies tuvieron un incremento en la expresión como consecuencia de la inoculación de los parásitos en D7 con respecto al control D0. Este resultado es consistente con lo reportado por Faisal *et al.*, (1998) quien sugiere que los inhibidores de serin proteasas contrarrestan el establecimiento de la infección de *P. marinus*, eliminando o neutralizándolo. Al comparar las especies se encontró mayor expresión de ambos inhibidores en *C. corteziensis* en comparación con *C. virginica*. Ambas especies tuvieron una disminución significativa de D7 comparado con D14 en cuanto al número de parásitos contabilizados, la reducción de aproximadamente 23% para *C. corteziensis* y 8% para *C. virginica*. Romestand *et al.*, (2002) observó un patrón similar con alta actividad de inhibidores de proteasas durante los días 3-10 post-infección precedida de una eliminación de parásitos iniciada a partir del día 7 post-inoculación, resultado similar al observado en este trabajo.

La respuesta inmune obtenida a partir de la inyección de *P. marinus* en la cavidad del ostión afecto igualmente a todos los tejidos empero sin embargo, la mayor actividad de los genes estudios en el presente estudio fue registrada en glándula digestiva . Los inhibidores de proteasas de serina fueron inicialmente identificados en la hemolinfa del ostión *C. gigas*, posteriormente en *C. virginica*, así como en la almeja *Mya arenaria* y *Spisula solidissima* (Nikapitiya *et al.*, 2010, Xue *et al.*, 2009, Kanost 1999); sin embargo glándula digestiva parece ser un tejido blanco en cuanto a niveles de expresión de inhibidores de serin proteasa se refiere, esto probablemente por la forma de inoculación de los parásitos, pues en condiciones naturales las branquias representa a uno de los primeros tejidos expuestos a

patógenos. La Peyre *et al.*, (2010) encontró mayores niveles de expresión de SPI-1 en los túbulos digestivos que en el resto de los tejidos incluyendo hemolinfa en *C. virginica* infectada por *P. marinus*. Xue *et al.*, (2009) encontró mayor expresión en este tejido usando hibridación *in situ* con ribosondas que reconocen SPI-2. Así mismo, la expresión en otros tejidos no fue detectada. Ambos inhibidores (SPI-1 y SPI-2) son miembros de la misma familia (I-84) y comparten el 54% de su secuencia de aminoácidos (Rawling *et al.*, 2004; Xue *et al.*, 2009) y fueron purificados a partir de plasma de ostiones *C. virginica* (Xue *et al.* 2006; Xue *et al.*, 2009; La Peyre *et al.*, 2010). Ambos suprimen Perkinsina y subtisilina la protease mas importante de *P. marinus*. Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran un patrón de expresión similar de ambos inhibidores, lo cual es consistente a La Peyre (2010) y Xue (2009).

#### Oxido nítrico sintasa (NOS)

Debido a que *P. marinus* secreta grandes cantidades de proteasas las cuales suprimen la respuesta inmune del ostión y facilitan la internalización del parásito a los tejidos (Faisal *et al.* 1999), esto trae como consecuencia la activación de oxido nítrico la cual es mediada por NOS (Brunet 2001). De acuerdo a Hughes *et al.*, (2010); las etapas tempranas de la infección son cruciales para el establecimiento u eliminación del parásito. Nuestros resultados muestran una importante expresión de este gen en D7 de ambas especies con significativa disminución al día 14, lo que sugiere la posibilidad de que la mayor actividad se de en los primero días de la infección. Jiang *et al.*, (2013) encontró máxima actividad de NOS 12 hrs post-estimulación, al retar escalopas (*Chlamys ferrerri*) con LPS,  $\beta$ -glucan y PGN, mientras que Li *et al.*, (2013) reportó que se expresa mayormente a las 24 hrs posterior a exposición de cangrejos *Scylla paramamosain* a *Vibrio parahemolyticus*.

Desafortunadamente no fue posible medir la expresión durante las primeras hora de exposición al patógeno, sin embargo como se menciono anteriormente, encontramos un aumento en la expresión en D7. De acuerdo a Chintala *et al.*, (2002); los parásitos dentro de las primeras horas son eliminados como consecuencia de la mayor defensa por parte del ostión seguido del establecimiento de la infección debido a la capacidad detoxificadora del parásito (Asojo *et al.*, 2007). Villamil *et al.*, (2007) encontró que NO parece ser no muy efectiva durante las primeras horas de la infección al infectar in vivo *C. virginicas* con *P. marinus*. Sus resultados muestran un incremento de la actividad de nitritos (usados como indicador de NO) a partir del día 6 e incrementa hasta el día 14 con posterior reducción hasta alcanzar sus niveles basales al día 35 post-infección. Una tendencia de expresión similar fue encontrada en este trabajo, donde ambas especies y en todos los tejidos excepto manto tuvieron la misma tendencia. Como se mencionó, *C. corteziensis* en todos los tejidos (excepto manto) presentó mayor expresión que *C. virginica*, este resultado se registró pese a que en esta especie se encontró mayor número de parásitos que en *C. corteziensis*. Este considerable aumento en la expresión podría sumarse a la propuesta de que *C. corteziensis* al igual que *C. gigas* y *C. ariakensis* poseen mecanismos mas eficaces para responder a la invasión de patógenos (Lacoste *et al.*, 2001; Romestand *et al.*, 2002; Moss *et al.*, 2006).

#### Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )

La liberación de citocinas (tumour-necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1b (IL-1b) y IL-6) quienes forman parte del proceso inflamatorio, pueden ser medidas, a fin de mejorar la comprensión de la función de estos genes durante este proceso (Alvaréz-Pellitero, 2008). Muchas substancias pueden inducir la producción de TNF- $\alpha$ , sin embargo esta citosina actúa inmediatamente para controlar la amenaza de un patógeno y subsecuentemente como parte de la respuesta inmune (Vassalli, 1992) regulada por NF-kB (Jiang y Wu, 2007) o activador



pro-apoptótico (Sokolova *et al.*, 2004). Nuestros resultados presentan diferencias significativas por efectos de la inoculación cuando se compara D0 con D7. Sin embargo, no hay diferencias entre D7 y D14, excepto en glándula digestiva de *C. corteziensis*. No hay reportes de la expresión de este gen modulada por *P. marinus*, pero existen estudios de en el cual liposacaridos de bacterias (LPS) son usados como inductores de expresión de TNF conocidos como LITAF. Este gen de respuesta rápida, alcanza sus mayores niveles de expresión durante las primeras 12 hrs posteriores a su exposición al patógeno (Xu *et al.*, 2012). Infecciones experimentales en *C. gigas* muestran que este gen se expresa mayormente en branquias, seguido de glándula digestiva, palpos labiales, manto y hemocitos (Park *et al.*, 2008), lo cual es diferente a lo obtenido en nuestros resultados pues glándula expreso los mayores niveles de ARNm. Esto posiblemente a que la inoculación de bacterias fue directamente en el agua y las branquias fue el primer tejido acumulo LPS y por consecuencia presenta la mayor expresión. El reto con *P. marinus* realizado en este trabajo fue mediante inyección en la cavidad del ostión. Hine (1999), indica que los hemocitos pueden activar interleucinas y TNF, mostrando muchas similitudes al mecanismo conocido en vertebrados (granulocitos-monocitos-macrofagos). Por ello, posiblemente los niveles de expresión detectados en D7, corresponde a una disminuida señal de mRNA de TNF pues de acuerdo a Lee (2013), este gen es modulado dentro de las primeras horas o días posterior a la infección y lo observado en D7 sea solo remanente de una previa actividad de este gen. Una importante discordancia encontrada en este estudio, es la aparentemente no relación entre TNF y NOS, debido a que el primero induce al segundo (NOS) y en nuestros resultados coinciden en D7 pero no en D14 de glándula digestiva y branquias excepto manto, los cuales parecen coincidir con esa relación, pues de acuerdo a Ottaviani (2006) TNF junto con las interleucinas inducen la producción de NOS.

### Proteína de choque térmico 70 (HSP70)

La expresión de HSP70 fue más eficiente en *C. virginica* que *C. corteziensis* excepto en glándula digestiva donde el ostión de placer lo expresó más. En general HSP70 presentó los niveles de expresión mas altos que el resto de los genes evaluados en este estudio. De acuerdo a Encomio y Chu (2007), *C. virginica* infectado con *P. marinus* y exponerlo a fluctuaciones térmicas incrementó considerablemente la expresión durante las dos primeras semanas, las cuales llegaron a mantenerse hasta por 4 semanas. Aunque las razones por las que HSP se mantiene expresada por largos periodos es desconocida, se especula que el choque térmico puede alterar la síntesis de proteínas y por lo tanto los mecanismos que controlan la regulación de la síntesis de HSP, lo que resulta en una menor rotación de las proteínas de choque térmico (Hochachka y Somero 2002). Además, la expresión de HSP70 puede permanecer estable durante varios días (Hofmann 1999). Chu y Li (2005) reportaron que HSP70 no parece reflejar las diferencias entre ostiones infectados con diferentes cargas parasitarias, indicando pues que este no distingue los efectos del agente infeccioso y no debería ser usado como indicador de estrés por patógenos. Sin embargo, Encomio y Chu en 2005 y 2007 encontraron que la infección de *P. marinus* podría contribuir con el incremento de las HSP's con y sin choque térmico, debido a que patógeno induce la expresión de estas proteínas. Un hallazgo interesante en nuestros resultados es la cantidad de mRNA de HSP70 detectada en branquias de *C. virginica*, lo cual posiblemente se deba a la carga parasitaria previa al experimento, por lo que los ostiones se encontraban inmunológicamente comprometidos.

### Superoxido dismutasa (SOD Cu/Zn)

Como consecuencia de la respuesta a la presencia de *P. marinus*, el ostión libera anión superóxido, por lo que la expresión de SOD podría estar relacionada con el parásito. Estudios previos han demostrado una importante relación entre SOD y LPS al infectar experimentalmente ostiones con bacterias (Gonzalez *et al.*, 2005). Empero, no hay estudios previos que indiquen este mismo patrón al infectar con *P. marinus*. En nuestro trabajo encontramos una importante respuesta de SOD tanto en glándula digestiva como en branquias, lo que sugiere una potencial modulación de este gen por la inoculación del parásito. El ostión del placer *C. corteziensis* alcanzó mayores niveles de expresión génica, lo que indica probablemente mayor eficiencia en la defensa que el ostión americano.

### Proteína inhibidora de la apoptosis (IAP) y Caspasa 3 (Casp-3)

El mecanismo apoptótico en ostiones de acuerdo a Goedken *et al.*, (2005), es activado en respuesta a la enfermedad de los ostiones y/o patogenicidad del parásito como medida de control a fin de evitar la dispersión del patógeno o bien la muerte del huésped. Sin embargo, esta podría estar ausente debido al papel regulador del parásito, el cual toma control del mecanismo apoptótico inhibiéndolo a fin de favorecer el establecimiento de la infección. En el presente estudio no se encontraron diferencias significativas en la expresión de IAP entre especies, sin embargo existe un incremento sutil de la expresión al comparar D0 con D7 y posteriormente en D14 en ambas especies lo que podría indicar que la inhibición de la apoptosis no fue requerida quizás porque la carga parasitaria no causó infecciones severas que comprometiera al organismo. De acuerdo a Zhang *et al.*, (2011), IAP se expresa con mayor intensidad dentro de las primeras 12 hrs post-infección, esto al inocular *V. anguillarum* en ostiones *C. gigas*, lo que podría explicar la ausencia de expresión

significativa con respecto al control D0 en el reto realizado. Igualmente, caspasa efectora 3 no presentó diferencia significativas entre tejidos de la misma especie ni entre especies. Sin embargo, *C. virginica* mostró los valores mas altos de expresión. Nuestra expectativa suponía un rol antagónico entre IAP y Casp-3, pues de mientras que *P. marinus* juega el papel de regulador de la apoptosis suprimiéndola mediante IAP (Kiss, 2010), se esperaba que tuviera una expresión significativamente mayor que D0 en ambas especies y por consecuencia inhibir el papel de Casp-3. Al observar los tiempo D7 y D14 de glándula digestiva en *C. virginica* parecen incrementar, sin embargo esto no es más que una simple especulación pues no fue posible medir su expresión posterior a los 14 días. Desafortunadamente no existe información sobre el papel de IAP y Casp-3 en periodos de exposición largos ante patógenos.

## 7. Conclusión

Estudios previos ya sean retos *in vivo* o *in vitro* han fijado su atención a la defensa del ostión ante el protozooario *P. marinus* durante las primeras horas de contacto. Esto es debido a que esas primeras horas son cruciales pues tanto el huésped como el parásito determinaran el establecimiento de la infección o la eliminación del parásito (Hughes *et al.*, 2010). Sin embargo, pocos trabajos han evaluado el papel de la respuesta inmune en periodo de tiempos largos en el cual el número de parásitos demanda de una respuesta inmune prolongada, quizás permanente (Shimokawa *et al.*, 2010).

*P. marinus* es un parásito intracelular que ha desarrollado una capacidad para penetrar los tejidos de *C. corteziensis* y *C. virginica* (Caceres-Martinez *et al.*, 2008; Huicab-Pech *et al.*, 2012) y evadir de manera eficiente las defensas inmunitarias celulares y humorales del huésped. *P. marinus* secreta un gran cantidad de proteasas (Romestand *et al.*, 2002), las cuales pueden suprimir la defensa inmune del huésped y facilitar la internalización del parásito (Faisal, 1998). Los resultados aquí mostrados no son concluyentes, sin embargo, detectamos una respuesta más eficiente por parte de *C. corteziensis* que a pesar de tener una menor carga parasitaria mantiene una alta expresión de genes relacionados a la defensa inmune en comparación con *C. virginica*. Al evaluar la actividad de inhibidores de proteasas de serina SPI-1 y SPI-2, pese al considerable incremento en su expresión post-inoculación, estos parece no ser suficientes para prevenir la infección debido a la capacidad evasora del parásito. La fagocitosis y el estallido respiratorio que se da como respuesta a la internalización de *P. marinus* son ineficaces para eliminar a los parásitos debido a la sobreproducción de superóxido dismutasa por *P. marinus* (PmSOD), el cual suprime el

papel del estallido respiratorio (Asojo *et al.*, 2006). Pese a la eficiencia del parásito para evadir la inmunidad del huésped, existe un mecanismo natural para resistir al parásito, la respuesta antioxidante. Ante la actividad de ROS, el huésped sintetiza SOD (Cu/Zn SOD) la cual contribuye a la detoxificación celular y su expresión otorga mayor resistencia en su lucha contra el parásito (González *et al.*, 2005). Esta respuesta determina los aspectos de las relaciones ostión-patógeno y contribuyen al éxito del establecimiento de la infección parasitaria (Pales Espinosa *et al.*, 2013). Una vez que la infección se ha establecido diversos mecanismos son activados, genes relacionados a la respuesta inflamatoria como TNF y NOS son activados en presencia de patógenos (Almeida *et al.*, 2000; Beutler *et al.*, 2003).

Los resultados presentados aquí suman elementos que podrían coadyuvar al entendimiento y potencial tolerancia de *C. corteziensis* ante *P. marinus*. HSP70 es una proteína que inicialmente fue descartada como gen modulado por *P. marinus* (Chu y Li, 2005), pero estudios posteriores parecen demostrar que ostiones infectados y no infectados con el parásito expresan diferencialmente HSP70, lo que sugiere que esta proteína está posiblemente vinculada a la presencia de patógeno (Encomio y Chu, 2007).

Un mecanismo que opera a favor del huésped es la apoptosis. La apoptosis (tipo I) ó la muerte celular programada (PCD I) se ha convertido en un actor importante en la defensa inmune de ostras y dentro de las relaciones ostiones-*P. marinus* (Sokolova, 2009). El parásito *P. marinus* parece regular la apoptosis inhibiéndola mediante la proteína inhibidora de la apoptosis ó IAP (Zhang *et al.*, 2012). Se ha demostrado que bajas cargas parasitarias parecen no afectar la actividad de IAP la cual se activa en niveles basales similar a la caspasa efectora 3 ó Casp-3 (Kiss, 2010). Pese a que la infección post-inoculación alcanzó los niveles ligero-moderado para *C. corteziensis* y moderado para *C. virginica*, estas parecen no haber promovido la actividad apoptótica debido, posiblemente a que la cantidad de

protozoarios no fue lo suficientemente fuerte para activar este mecanismo. Los resultados aquí presentados son solo evidencia parcial y no concluyentes de que *C. corteziensis* es tolerante/resistente a *P. marinus*, sin embargo parece tener una respuesta inmune mas eficiente que *C. virginica*.

Un factor a considerar es, que aunque experimentalmente se inocularon alta carga de parásitos a cada organismo experimental sin que se observaran muertes debido a la baja tasa de incorporación del patógeno a los tejidos del ostión o quizás al corto periodo del experimento. En condiciones de cultivo, *C. virginica* (hasta 36 meses) permanece expuesto por mucho mas tiempo que *C. corteziensis* (13 meses) lo que representa una desventaja para la especie americana (Mazón-Suasteguí *et al.*, 2011) la cual permanece combatiendo al parásito por periodos mucho mas largos, aunque al cultivarse a temperaturas bajas, la patogenicidad de *P. marinus* se ve reducida (Villalba *et al.*, 2004). Por otro lado, *C. corteziensis* es cultivado a temperaturas mas altas, lo cual favorece su crecimiento alcanzando su talla comercial mucho más rápido aunque teniendo como desventaja el nivel de patogenicidad del parásito el parece estar relacionado a temperaturas altas (Mazón-Suasteguí *et al.*, 2011).

## 8 LITERATURA CONSULTADA

1. Abbas A.K., Lichtman A.H. 2000. General properties of immune responses. En: “Cellular and molecular immunology”. Interamericana McGraw Hill.
2. Ahmed H., Vasta G.R. 1996. Glycosidases in *Perkinsus marinus*: Purification and characterization of P-D-glucosidase. Proceedings of the National Shellfish Association 88: 47.
3. Allam B., Ford S.E. 2002. Transport of particles across epithelia from oyster mantle cavity: a model for *Perkinsus marinus* invasion. J Shellfish Res 21:371
4. Almeida, M., Berthe, F., Thebault, A., Teresa, M. 1999. Whole clam culture as a quantitative diagnostic procedure of *Perkinsus atlanticus* ž Apicomplexa , *Perkinsea* / in clams *Ruditapes decussatus*. *Aquaculture*, 325–332.
5. Alvarez-Pellitero, P. 2008. Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 126(3-4), 171–98. doi:10.1016/j.vetimm.2008.07.013
6. Andrews J.D. 1996. History of *Perkinsus marinus*, a pathogen of oysters in Chesapeake Bay 1950-1984. J. Shellfish Res. 15:13-16.
7. Andrews J.D. Ray S.M. 1988. Management strategies to control the disease cause by *Perkinsus marinus*. American Fisheries Society Special Publication 18: 257- 264.
8. Applied Biosystems 2008. Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR.
9. Asojo O.A., Schott E.J., Vasta G.R. Silva A.M. 2006. Structures of PmSOD1 and PmSOD2, two superoxide dismutases from the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun 62



10. Azevedo C. 1989. Fine structure of *Perkinsus atlanticus* n. sp. (Apicomplexa, Perkinsea), a parasite of the clam *Ruditapes decussatus* from Portugal. *Journal of Parasitology* 75: 627–635.
11. Barber B.J., Mann R. 1994. Growth and mortality of eastern oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791), and Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) under challenge from the parasite *Perkinsus marinus*. *J. Shellfish Res* 13:109–114
12. Barnes R.D. 1986. *Zoología de los Invertebrados*. México. Cuarta Edición. Interamericana. 1157 pp.
13. Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Wheeler D.L. 2006. Genbank *Nucleic Acids Res.* 34:16-20
14. Beutler, B., Hoebe, K., Du, X., & Ulevitch, R. J. 2003. How we detect microbes and respond to them : the Toll-like receptors and their transducers the first minutes following contact between host, 74. doi:10.1189/jlb.0203082. *Journal*
15. Blackbourn, J., Bower S.M. Meyer G.R. 1998. *Perkinsus qugwadi* sp. nov. (incertae sedis), a pathogenic protozoan parasite of Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis*, cultured in British Columbia, Canada. *Canadian Journal of Zoology* 76: 942–953.
16. Bosch T.C., Krylow S.M., Bode H.R., Steele R.E. 1988. Thermo- tolerance and synthesis of heat shock proteins: These responses are present in *Hydra attenuata* but absent in *Hydra oligactis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:7927–7931
17. Bower, S.M., Blackbourn J. Meyer G.R. 1998. Distribution, prevalence, and pathogenicity of the protozoan *Perkinsus qugwadi* in Japanese scallops,

- Patinopecten yessoensis*, cultured in British Columbia, Canada. Canadian Journal of Zoology 76: 954–959
18. Brunet, L. R. 2001. Nitric oxide in parasitic infections. *International Immunopharmacology*, 1(8), 1457–67.
  19. Burreson, E.M., Alvarez R.S., Martinez V.V. Macedo L.A. 1994. *Perkinsus marinus* (Apicomplexa) as a potential source of oyster *Crassostrea virginica* mortality in coastal lagoons of Tabasco, Mexico. *Disease of Aquatic Org.* 20: 77 – 82.
  20. Burreson, E.M. Ragone Calvo L.M. 1996. Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of oysters in Chesapeake Bay, with emphasis on data since 1985. *J. Shellfish Research* 15:17 -34.
  21. Buroker N.E. 1983. Population genetics of the American oyster *Crassostrea virginica* along the Atlantic coast and Gulf of Mexico. *Marine Biology* 75:99-112.
  22. Bushek D., Allen S.K., Alcox K.A., Gustafson R.G., Ford S.E. 1997. Response of *Crassostrea virginica* to in vitro cultured *Perkinsus marinus*: preliminary comparisons of three inoculation methods. *J Shellfish Res* 16: 479–485
  23. Bushek, D., Ford S.E., Chintala M.M. 2002. Comparison of in vitro-cultured and wild-type *Perkinsus marinus*. III. Fecal elimination and its role in transmission. *Dis. Aquat. Organ.* 51, 217–225
  24. Brugerolle G. 2002. *Cryptophagus subtilis*: a new parasite of cryptophytes affiliated with the Perkinsozoa lineage. *Eur. J. Protistol.* 37, 379–390.
  25. Cáceres-Martínez J., Vásquez-Yeomans R., Padilla-lardizábal G., Río, M. A. 2008. *Perkinsus marinus* in pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* from Nayarit Pacific coast of México. *Program*, 99, 66–73. doi:10.1016/j.jip.2008.03.005

26. Cáceres-Martínez J., Vasquez-Yeomans R., Padilla-Lardizábal G. 2010. Parasites of the pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* cultured in Nayarit, Mexico. *Journal of aquatic animal health*, 22(3), 141–51. doi:10.1577/H09-052.1
27. Cáceres-Martínez J., Ortega M. G., Vásquez-Yeomans R., García T. D. J. P., Stokes N. A., Carnegie, R.B. 2012. Natural and cultured populations of the mangrove oyster *Saccostrea palmula* from Sinaloa, Mexico, infected by *Perkinsus marinus*. *Journal of invertebrate pathology*, 110(3), 321–5. doi:10.1016/j.jip.2012.03.019
28. Casas, S. M., La Peyre, J. F., Reece, K. S., Azevedo, C., Villalba, A. 2002. Continuous in vitro culture of the carpet shell clam *Tapes decussatus* protozoan parasite *Perkinsus atlanticus*. *Diseases of aquatic organisms*, 52(3), 217–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12553450>
29. Casas S.M., Grau A., Reece K.S., Apakupakul K., Azevedo C., Villalba A. 2004. *Perkinsus mediterraneus* sp., a protistan parasite of the European flat oyster *Ostrea edulis* from the Balearic Islands, Mediterranean Sea. *Dis. Aquat. Organ.* 58, 231–244.
30. Casas S.M., Kimberly S.R., Yanli L., Moss J.A., Villalba A., La Peyre J.F. 2008. Continuous Culture of *Perkinsus mediterraneus*, a Parasite of the European Flat Oyster *Ostrea edulis*, and Characterization of Its Morphology, Propagation, and Extracellular Proteins in Vitro. *Society*, 55(1), 34–43. doi:10.1111/j.1550-7408.2008.00301.x.
31. Cerenius L. Söderhäll K. 2013. Variable immune molecules in invertebrates *J Exp Biol* 216:4313-4319.

32. Calkins C.C., Sloane B.F. 1995. Mammalian cysteine protease inhibitors: biochemical properties and possible roles in tumor progression. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 376:71–80
33. Castillo-Duran A., Chavez-Villalba J., Arreola-Lizarraga A., Barraza-Guardado R. 2010. Comparative growth, condition, and survival of juvenile *Crassostrea gigas* and *C. corteziensis* oysters cultivated in summer and Winter. *Ciencias Marinas*. Num.1 Vol.36
34. Circu M.L., Aw T.Y. 2008. Glutathione and apoptosis. *Free Radic. Res.* 42: 689-706.
35. Chang, P.H., Kuo, S.T., Lai, S.H., Yang, H.S., Ting, Y.Y., Hsu, C.L., Chen, H.C., 2005. Herpes-like virus infection causing mortality of cultured abalone *Haliotis diversicolor supertexta* in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.* 65, 23–27
36. Chavez-Villalba, J., Lopez-Tapia, M., Mazon-Suastegui, J., Robles-Mungaray, M. 2005. Growth of the oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) in Sonora, Mexico. *Aquaculture Research*, 36(14), 1337–1344. doi:10.1111/j.1365-2109.2005.01345.x
37. Cheng, T.C., 1996. Hemocytes: Forms and functions. In: Kennedy, V.S., Newell, R.I.E., Eble, A.F. (Eds.), *The Eastern Oyster Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant Book, pp. 299–333. College Park, MD.
38. Cheng C. T. 1983. The role of lysosomes in molluscan inflammation. *Am. Zool.* 23:129-144.
39. Cheng, T. C. 1981. *Bivalves*. London: Academic Press. pp. 233-300.
40. Cheng, T. C. 1975. Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes. *Ann. NY. Acad. Sci.* 266:343–379

41. Chintala, M. M., Bushek, D., & Ford, S. E. 2002. *Perkinsus marinus* . II . Dosing methods and host response. *Diseases Of Aquatic Organisms*, 51, 203–216.
42. Choi, K.S., K.L. Park, K.W. Lee, Matsuoka K. 2002. Infection intensity, prevalence and histopathology of *Perkinsus* sp. in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, in Isahaya Bay, Japan. *Journal of Shellfish Research* 21: 119–125.
43. Choi K.S. y Park K.I. 2010. Review on the protozoan parasite *Perkinsus olseni* (Lester and Davis 1981) infection in Asian waters. En: Ishimatsu, A., Lie, H.J. (Eds.), *Coastal Environmental and Ecosystem Issues of the East China Sea*. Terrapub and Nagasaki University, pp. 269–281.
44. Chu F.L.E., 1996. Laboratory investigations of susceptibility, infectivity and transmission of *Perkinsus marinus* in oysters. *J. Shellfish Res.* 15, 57–66. Chu,
45. Chu, F. L., La Peyre J.F. 1989. Effect of environmental factors and parasitism on hemolymph lysozyme and protein of American oysters (*Crassostrea virginica*). *J. Invert. Pathol.* 54:224-232
46. Comisión Nacional de Acuacultura y pesca CONAPESCA. 2008. Programa maestro nacional de ostión. Consultado en: Julio de 2009 <http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx>
47. CONAPESCA. Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca. 2013. [http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/consulta\\_especifica\\_por\\_produccion](http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/consulta_especifica_por_produccion)
48. Corradin S.A., Ransijn G. Corradin J., Bouvier M.B. Delgado J., Fernandez-Carneado J.C. Mottram G., Vergeres G., Mauel J. 2002. Novel peptide inhibitors of *Leishmania* gp63 based on the cleavage site of MARCKS-related protein. *Biochemistry Journal* 367: 761-769.
49. Coss C.A., Robledo J.A., Ruiz G.M., Vasta G.R. 2001. Description of *Perkinsus*

- andrewsi* n. sp. isolated from the Baltic clam (*Macoma balthica*) by characterization of the ribosomal RNA locus, and development of a species-specific PCR-based diagnostic assay. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 48: 52–61
50. Corpet F. 1998. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering", *Nucl. Acids Res.*, 16 (22), 10881-10890
51. Craig A, Powell EN, Fay RR et al (1989) Distribution of *Perkinsus marinus* in Gulf Coast oyster populations. *Estuaries* 12:82–91. doi:10.2307/1351499 Dame
52. Creagh E.M., Conroy H., Martin S.J. Caspase activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunol. Rev.* 193: 10-21, 2003.
53. De Groote M. A., Ochsner U. A., Shiloh M. U., Nathan C., McCord J. M., Dinauer M. C., Libby S. J., Vazquez-Torres A., Xu Y., Fang F. C. 1997. Periplasmic superoxide dismutase protects *Salmonella* from products of phagocyte NADPH-oxidase and nitric oxide synthase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 94, 13997–14001.
54. Desriac F., Defer D., Bourgougnon N., Brillet B., Le Chevalier P., Fleury Y. 2010. Bacteriocin as weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: inventory and potential applications as an aquaculture probiotic. *Mar. Drugs* 8, 1153–1177.10.3390/md8041153
55. Diaz Patricia. 2006. Papel de las actividades superóxido dismutasa y catalasa en la virulencia de *Photobacterium damsela* subsp. piscicida. Estrategias para la estimulación del estallido respiratorio en fagocitos de lenguados cultivados. Tesis doctoral. Universidad de malaga, España.
56. Earnhart, C. G., Vogelbein, M. A., Brown, G. D., Reece, K. S., & Kaattari, S. L. 2004. Supplementation of *Perkinsus marinus* Cultures with Host Plasma or Tissue

- Homogenate Enhances Their Infectivity. *Society*, 70(1), 421–431.  
doi:10.1128/AEM.70.1.421.
57. De Faveri, J, Smolowitz, R. M., & Roberts, S. B. 2009. Development and Validation of a Real-Time Quantitative PCR Assay for the Detection and Quantification of *Perkinsus marinus* in the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*. *Journal of Shellfish Research*, 28(3), 459–464. doi:10.2983/035.028.0306
58. Donaghy L., Lambert C., Choi K.S., Soudant P. 2009. Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*): Current knowledge and future prospects. *Aquaculture* 297: 10–24.
59. Du, Y., Zhang, L., Xu, F., Huang, B., Zhang, G., Li, L. 2013. Validation of housekeeping genes as internal controls for studying gene expression during Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) development by quantitative real-time PCR. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(3), 939–45. doi:10.1016/j.fsi.2012.12.007
60. Dungan, C. F. y R. M. Hamilton. 1995. Use of a tetrazolium-based cell proliferation assay to measure effects of in vitro conditions on *Perkinsus marinus* (Apicomplexa) proliferation. *J. Euk. Microbiol.* 42:379– 388.
61. Dungan C.F., Reece K.S., 2006. In vitro propagation of two *Perkinsus* spp. parasites from Japanese Manila clams *Venerupis philippinarum* and description of *Perkinsus honshuensis* n. sp.. *J. Eukaryot. Microbiol.* 53, 316–326.
62. Eble A.F., Scro R. 1996. General Anatomy. In V.S. Kennedy, R.I. E. Newell & A.F. Eble (eds.). *The Eastern Oyster Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant College, Maryland. 734 p.
63. Encomio V.G., Chu F.L.E. 2007. Heat shock protein (hsp70) expression and thermal tolerance in sublethally heat-shocked eastern oysters *Crassostrea virginica* infected

- with the parasite *Perkinsus marinus*. Diseases of aquatic organisms, 76(3), 251–60.  
doi:10.3354/dao076251
64. Encomio V.G., Chu F.L.E. 2005. Seasonal variation of heat shock protein 70 in eastern oysters (*Crassostrea virginica*) infected with *Perkinsus marinus* (Dermo). J Shellfish Res 24:167–175 Encomio
65. Enriquez-Espinoza, T. L., J. M. Grijalva-Chon, R. Castro-Longoria, and J. Ramos-Paredes. 2010. *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* in the Gulf of California. Diseases of Aquatic Organisms 89: 269-273.
66. Enríquez-Ocaña L.F., M. Nieves-Soto, P. Piña-Valdez, L.R. Martínez-Cordova y María A. Medina-Jasso. 2012. Evaluation of the combined effect of temperature and salinity on the filtration, clearance rate and assimilation efficiency of the mangrove oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951). Archives of Biol Scis Belgrade. 64(2): 479-488
67. Escobedo-Fregoso, C., Arzul, I., Carrasco, N., Gutiérrez-Rivera, J. N., Llera-Herrera, R., & Vázquez-Juárez, R. 2013. Polymorphism at the ITS and NTS Loci of *Perkinsus marinus* Isolated from Cultivated Oyster *Crassostrea corteziensis* in Nayarit, Mexico and Phylogentic Relationship to *P. marinus* along the Atlantic Coast. *Transboundary and Emerging Diseases*. doi:10.1111/tbed.12090
68. Faisal M. E. Oliver J. L., Kaattari S. L. 1999. Role of protease- antiprotease interactions in *Perkinsus marinus* infection in *Crassostrea* spp. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 19: 269-276.
69. Faisal, M., Macintyre, E. A., Adham, K. G., Tall, B. D., Kothary, M. H., La Peyre, J. F. 1998. Evidence for the presence of protease inhibitors in eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*Crassostrea gigas*) oysters, 121, 161–168.



70. FAO, 2012. Aquaculture production: quantities and values 1950–2010. Fishstat Plus. Published electronically on the internet, available directly from <http://www.fao.org/fi/statist/fisoft/FISHPLUS.asp#Download>. Glude,
71. Farley C.A. 1968. *Minchinia nelsoni* (Haplosporidia) disease syndrome in the American oyster, *Crassostrea virginica*. J. Protoz. 15: 585-599
72. Ford S., Figueras A., Haskin H. 1990. Influence of selective breeding, geographic origin, and disease on gametogenesis and sex ratios of oysters, *Crassostrea virginica*, exposed to the parasite *Haplosporidium nelsoni* (MSX). Aquaculture 88: 285-301.
73. Feig C., Peter M.E. 2007. How apoptosis got the immune system in shape. Eur. J. Immunol. 37: 61-70
74. Fisher W.S. 1986. Structure and functions of oyster hemocytes. In: Brehelin, M. (Ed.), Immunity in Invertebrates. Springer Verlag, Heidelberg, pp. 25-35
75. Ford S.E. 1996. Range extension by the oyster parasite *Perkinsus marinus* into the northeastern United States: response to climate change J. Shellfish Res 15: 45 – 56.
76. Ford S.E., Tripp M.R. 1996. Diseases and defense mechanisms. In: Newell RIE, Kennedy VS, Eble AF (eds) The eastern oyster *Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant College, College Park, MD, p 383–450
77. Ford S.E., Schotthoefer A., Spruck C. 1999. In vivo dynamics of the microparasite *Perkinsus marinus* during progression and regression of infections in eastern oysters. Journal of Parasitology 85: 273– 282.
78. Garreis K.A., La Peyre J.E., Faisal M. 1996. The effects of *Perkinsus marinus* extracellular products and purified proteases on oyster defense parameters in vitro. Fish and Shellfish Immunology 6: 581-597.

79. Gauthier, J. D., and G. R. Vasta. 1995. In vitro culture of the eastern oyster parasite *Perkinsus marinus*: optimization of the methodology. *Journal of Invertebrate Pathology* 66: 156-168
80. Gestal, C., Novoa, B., Figueras, A., Marinas, I. D. I., Cabello, C. E. 2009. Differentially expressed genes of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* against *Perkinsus olseni*. *Fish & Shellfish Immunology* (2009), 72–83. doi:10.1016/j.fsi.2008.03.002
81. Glinski Z., Jarosz J. 1997. Molluscan immune defense. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* (Warsz) 45: 149- 155
82. Goedken M., Morsey B., Sunila I. 2005. The effects of temperature and salinity on apoptosis of *Crassostrea virginica* hemocytes and *Perkinsus marinus*. *J Shellfish Res* 24(1):177–183
83. Goldsborough W. Meritt D. 2001. Oyster Gardening for Restoration and Education. Maryland Sea Grant College Program for the Oyster Alliance Publication Number UM-SG-SGEP-99-05 1-12 p.
84. Goggin C.L. 1994. Variation in the two internal transcribed spacers and 5.8S ribosomal RNA from five isolates of the marine parasite *Perkinsus* (Protista, Apicomplexa). *Mol. Biochem. Parasitol.*, 65: 179–182.
85. Goggin C.L., Lester, R.J.G., 1995. *Perkinsus*, a protistan parasite of abalone in Australia: a review. *Mar. Freshwater Res.* 46, 639–646.
86. Gonzalez, M., Romestand, B., Fievet, J., Huvet, A., Lebart, M.-C., Gueguen, Y., Bachere, E., 2005. Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 1089.

87. Grizzle R.E., Adams J.R., Walters L.J. 2002. Historical changes in intertidal oyster (*Crassostrea virginica*) reefs in a Florida lagoon potentially related to boating activities. *Journal of Shellfish Research* 21:749-756.
88. Guo LY, Hung TM, Bea KH, Shin EM, Zhou HY, Hong YN, Kang SS, Kim HP, Kim YS. 2008. Anti-inflammatory effects of schisandrin isolated from the fruit of *Schisandra chinensis* baill. *J Pharmacology* 597: 293-299.
89. Gutiérrez, J. N., Duncan, N. J., Estañol, P. V., García-Aguilar, N., García-Gasca, A. 2003. Partial cloning and expression of the cyclin B gene in the ovary of the bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus*). *Journal of Experimental Zoology. Part A, Comparative Experimental Biology*, 295(2), 211–6. doi:10.1002/jez.a.10229
90. Hartl, F. U. 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381, 571–579.
91. He Y., Yu H., Bao Z., Zhang Q., Guo, X. 2012. Mutation in promoter region of a serine protease inhibitor confers *Perkinsus marinus* resistance in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Fish & shellfish immunology*, 33(2), 411–7. doi:10.1016/j.fsi.2012.05.028
92. Hégaret, H., da Silva, P.M., Wikfors, G.H., Lambert, C., De Bettignies, T., Shumway, S.E., Soudant, P., 2007. Hemocyte responses of Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, with varying parasite, *Perkinsus olseni*, severity to toxic-algal exposures. *Aquat. Toxicol.* 84, 469-479.
93. Hengartner MO. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407: 770-776.
94. Hine, P. M. 1999. The inter-relationships of bivalve haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, 367–385.

95. Hochachka P.W., Somero G.N. 2002. Biochemical adaptation. Oxford University Press, New York
96. Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A. Jr. and Ezekowitz, R. A. B. 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284, 1313-1318
97. Hughes, F.M., Foster, B., Grewal, S., Sokolova, I.M., 2010. Apoptosis as a host defense mechanism in *Crassostrea virginica* and its modulation by *Perkinsus marinus*. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 247–257.
98. Huicab-Pech Z.G., Curiel-Ramírez S., Castañeda-Chávez M., FLR, PCA 2012. Seasonal variation of *Perkinsus marinus* in the american oyster *Crassostrea virginica* from the Carmen-Machona- Pajonal lagoon system in Tabasco, Mexico. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15(SUP-2), 40–50
99. Humason L. 1979. Animal tissue techniques, 4th ed. W. H. Freeman and Co., San Francisco, 661 p.
100. Ivanina A.V., Eilers S., Kurochkin I.O., Chung J.S., Techa S., Piontkivska H., Sokolov E. P., Sokolova I.M. 2010. Effects of cadmium exposure and intermittent anoxia on nitric oxide metabolism in eastern oysters, *Crassostrea virginica*. *The Journal of Experimental Biology* 213, 433-444
101. Jiang Q., Zhou Z., Wang L., Wang L., Yue F., et al., 2013. A Scallop Nitric Oxide Synthase (NOS) with Structure Similar to Neuronal NOS and Its Involvement in the Immune Defense. *PLoS ONE* 8(7): e69158. doi:10.1371/journal.pone.0069158
102. Kanost, M.R. 1999. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. *Dev Comp Immunol* 23:291–301
103. Keen, A.M., 1971. Sea shells of Tropical West America. Marine Mollusks from Baja California to Peru. 2nd. Edition. Stanford University Press. U.S.A. 1064 p.

104. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26(4):239–257 81.
105. Kennedy, V.S., R.I.E. Newell, and A.F. Ebel. 1996. *The Eastern Oyster Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant College, University of Maryland, College Park, Maryland.
106. Kim, J. Y., Kim, Y. M., Cho, S. K., Choi, K. S., Cho, M. 2008. Noble tandem-repeat galectin of Manila clam *Ruditapes philippinarum* is induced upon infection with the protozoan parasite *Perkinsus olseni*. *Developmental and Comparative Immunology*, 32(10), 1131–41. doi:10.1016/j.dci.2008.03.002
107. Kim, Y.M., Park, K.-I., Choi, K-S., Alvarez, R.A., Cummings, R.D., Cho, M., 2006. Lectin (MCL) from the Manila clam *Ruditapes philippinarum* is induced upon infection with the protozoan parasite *Perkinsus olseni*. *J. Biol. Chem.* 281, 26854–26864
108. Kiss, T., 2010. Apoptosis and its functional significance in molluscs. *Apoptosis* 15, 313–321.
109. Klemba M, Goldberg D.E. 2002. Biological roles of proteases in parasitic protozoa. *Annu Rev Biochem*;71:275–305
110. Korhonen, R., Lahti, A., Kankaanranta, H., Moilanen, E. 2005. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Current drug targets. Inflammation and allergy*, 4(4), 471–9.
111. Kuvardina, O.N., Leander, B.S., Aleshin, V.V., Myl'nikov, A.P., Keeling, P.J., Simdyanov, T.G., 2002. The phylogeny of colpodellids (Alveolata) using small subunit rRNA gene sequences suggests they are the free-living sister group to

- apicomplexans. *J. Eukaryot. Microbiol.* 49, 498–504.
112. Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S. K., Cueff, A., Poulet, S. A. 2001. Stress and Stress-Induced Neuroendocrine Changes Increase the Susceptibility of Juvenile Oysters ( *Crassostrea gigas* ) to *Vibrio splendidus*. *Society*, 67(5), 2304–2309. doi:10.1128/AEM.67.5.2304
113. La Peyre J.F., Qing-Gang Xue, Naoki Itoh 1, Yanli Li, Richard K. Cooper. 2010. Serine protease inhibitor cvSI-1 potential role in the eastern oyster host defense against the protozoan parasite *Perkinsus marinus* *Developmental and Comparative Immunology* 34:84–92
114. La Peyre, J. E, D. Y. Schafhauser, E. H. Rizkalla, And M. Faisal. 1996. Production of serine proteases by the oyster pathogen *Perkinsus marinus* (Apicomplexa) in vitro. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 42: 544-551.
115. La Peyre, J. F., D.Y.Schafhauser, E.H.Rizkalla y M. Faisal. 1995. Production of serine proteases by the oyster pathogen *Perkinsus marinus* (Apicomplexa) in vitro. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 42: 544– 551.
116. La Peyre, J. F., M. Faisal, and E. M. Burreson. 1993. In vitro propagation of the protozoan *Perkinsus marinus*, a pathogen of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 40: 304-310. Levine,
117. Laskowski Jr., M., Kato, I., 1980. Protein inhibitors of proteinases. *Annu. Rev. Biochem.* 49, 593–626.
118. Leander, B.S., Keeling, P.J., 2004. Early evolutionary history of dinoflagellates and apicomplexans (Alveolata) as inferred from hsp90 and actin phylogenies. *J. Phycol.* 40, 341–350.

119. Le Roux F, Audermard C, Barnaud A, Berthe F. 1999. DNA probes as potential tools for detection of *Marteilia refringens*. *Mar Biotechnol* 1:6
120. Lester, R.J.G. and G.H.G. Davis. 1981. A new Perkinsus species (Apicomplexa, Perkinsea) from the abalone, *Haliotis ruber*. *Journal of Invertebrate Pathology* 37: 181–187.
121. Levine, N. D. 1978. Perkinsus gen. n. and other new taxa in the protozoan phylum Apicomplexa. *Journal of Parasitology* 64:549.
122. Lindquist S. 1986. The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* 55:1151–1191
123. Lopez, C., Carballal, M.J., Azevedo, C., Villalba, A., 1997. Enzyme characterization of the circulating haemocytes of the carpet shell clam, *Ruditapes decussatus* (Mollusca: bivalvia). *Fish Shellfish Immunol.* 7, 595-608.
124. McKerrow JH, Caffrey C, Kelly B, Loke P, Sajid M. 2006. Proteases in parasitic diseases. *Annu Rev Pathol Mech Dis*;1:497–536.
125. McLaughlin, S.M., B.D. Tall, A. Shaheen, E. Elsayed and M. Faisal. 2000. Zoosporulation of a new Perkinsus species isolated from the gills of the softshell clam *Mya arenaria*. *Parasite* 7: 115–122
126. Mackin, J.G., 1962. Oyster disease caused by *Dermocystidium marinum* and other microorganisms in Louisiana. *Publicationes Institute of Marine Sciences. Univ Texas* 7: 132-229.
127. Mackin, J. G. 1951. Histopathology of infections of *Crassostrea virginica* (Gmelin) by *Dermocystidium marinum* Mackin, Owen, and Collier. *Bull. Mr. Sci. Gulf and Caribbean* 1: 72 – 87.
128. Mackin, J.G., H.M. Owen and A. Collier. 1950. Preliminary note on the

- occurrence of a new protistan parasite, *Dermocystidium marinum* n. sp. in *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Science* 111: 328 – 329.
129. Marsh, A. D., J. D. Gauthier, and G. R. Vasta. 1995. A semi-quantitative PCR assay for assessing *Perkinsus marinus* infections in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Parasitol.*, 81: 577–583.
130. Martínez G., Shaw M., Carrillo M. Zanuy S. 1998. Protein Salting-Out Method Applied to Genomic DNA Isolation from Fish Whole Blood. *BioTechniques* 24:238-239
131. Mazon Suastegui J., Mara Cruz Garcia, Jorge Chavez-Villalba, Carmen Rodriguez-Jaramillo & Pedro E Saucedo. 2011. Analysis of growth and first reproduction of hatchery-reared juvenile Cortez oyster ( *Crassostrea corteziensis*) in northwestern Mexico: proposal of a minimal fishing size. *Aquaculture Research*, 1:11
132. Medzhitov R. y Janeway Jr. C. 2000. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev*;173:89–97.
133. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway Jr., C. A. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394–397.
134. Meyers JA, Burreson EM, Barber BJ, Mann R. 1991. Susceptibility of diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) and eastern oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) to *Perkinsus marinus*. *J. Shellfish Res* 10:433–437
135. Meza, I. 2000. Extracellular matrix-induced signaling in *Entamoeba histolytica*: Its role in invasiveness. *Parasitology Today* 16: 23-28.



136. Mignotte B, Vayssiere J-L. Mitochondria and apoptosis. *Eur. J. Biochem.* 252: 1-15, 1998.
137. Mohandas, A. y Cheng T. C. 1985. Release pattern of aminopeptidase from *Biomphalaria glabrata* hemocytes subjected to high-level bacterial challenge. *J Invert Pathol* 45:298-303.
138. Montes, J.F., Durfort, M., Garcíavalero, J., 1995. Characterization and localization of an Mr 225-Kda polypeptide specifically involved in the defense-mechanisms of the clam *Tapes semidecussatus*. *Cell Tissue Res.* 280, 27-37.
139. Montes, J.F., Dufort, M., García-Valero, J., 1996. When the venerid clam *Tapes decussatus* is parasitized by the protozoan *Perkinsus* sp. it synthesizes a defensive polypeptide that is closely related to p225. *Dis. Aquat. Org.* 26, 149-157
140. Moreira, R., Balseiro, P., Romero, a, Dios, S., Posada, D., Novoa, B., & Figueras. 2012. Gene expression analysis of clams *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus* following bacterial infection yields molecular insights into pathogen resistance and immunity. *Developmental and Comparative Immunology*, 36(1), 140–9. doi:10.1016/j.dci.2011.06.012
141. Morsey, B., Sunila, I., Dungan, C., Guise, S. D. E. 2005. The Effects Of Temperature And Salinity On Apoptosis Of *Crassostrea Virginica* Hemocytes And *Perkinsus Marinus*, 24(1), 177–183.
142. Moss, J.A., J. Xiao, C.F. Dungan and K.S. Reece. 2008. Description of *Perkinsus beihaiensis* n. sp., a new *Perkinsus* sp. parasite in oysters of southern China. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 55: 117– 130.

143. Moss JA, Burreson EM, Reece KS (2006) Advanced *Perkinsus marinus* infections in *Crassostrea ariakensis* maintained under laboratory conditions maintained under laboratory conditions, 25(1), 65–72.
144. Muñoz, P., Vance, K., & Gómez-Chiarri, M. 2003. Protease activity in the plasma of American oysters, *Crassostrea virginica*, experimentally infected with the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *The Journal of Parasitology*, 89(5), 941–51. doi:10.1645/GE-3126
145. Navarro Barrera Ananda Aracely. 2011. Distribución, prevalencia e intensidad de *Perkinsus marinus*, parásito del ostión de placer *Crassostrea corteziensis*, en el estado de Nayarit, México. Tesis de Maestría CICESE.
146. Nikapitiya C, De Zoysa M, Oh C, Lee Y, Ekanayake PM, Whang I, Lee J (2010) Disk abalone (*Haliotis discus discus*) expresses a novel antistasin-like serine protease inhibitor: Molecular cloning and immune response against bacterial infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 28(4), 661–71. doi:10.1016/j.fsi.2009.12.027
147. Noren, E., Moestrup O., y REHNSTAM-HOLM A.S. 1999. Parvilucifera infectans Noren et Moestrup gen. et sp. Nov. (Perkinsoa phylum): A parasitic flagellate capable of killing toxic microalgae. *European Journal of Protistology* 35: 233-254.
148. OIE. International Aquatic Animal Health Code.OIE, Paris, 7th edition (2006).
149. Ordas, M. C., B. Novoa, M. Faisal, S. M. Mclaughlin, And A. Fi- Gueras. 2001. Proteolytic activity of cultured *Pseudoperkinsus tapetis* extracellular

- products. *Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry and Molecular Biology* 130: 199-206.
150. Ottaviani, E. 2006. Molluscan immunorecognition, 50–63.
151. Ottinger, C., T. Lewis, D. Shapiro, M. Faisal, And S. L. Kaattari. 2001. Detection of *Perkinsus marinus* extracellular proteins in tissues of the Eastern oyster *Crassostrea virginica*: Potential use in diagnostic assays. *Journal of Aquatic Animal Health* 13: 133-141.
152. Pales Espinosa, E., Winnicki, S., Allam, B. 2013. Early host-pathogen interactions in a marine bivalve: *Crassostrea virginica* pallial mucus modulates *Perkinsus marinus* growth and virulence. *Diseases of Aquatic Organisms*, 104(3), 237–47. doi:10.3354/dao02599
153. Park, E.-M., Kim, Y.-O., Nam, B.-H., Kong, H. J., Kim, W.-J., Lee, S.-J., ... Choi, T.-J. 2008. *Cloning, characterization and expression analysis of the gene for a putative lipopolysaccharide-induced TNF-alpha factor of the Pacific oyster, Crassostrea gigas. Fish & shellfish immunology*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17980621>
154. Park K., Ngo T. T. T., Choi S., Cho M., Choi, K. 2006. Occurrence of *Perkinsus olseni* in the Venus clam *Protothaca jedgeensis* in Korean waters. *Journal of Invertebrate Pathology*, 93, 81–87. doi:10.1016/j.jip.2006.04.007
155. Park, K.-I. and K.-S. Choi. 2001. Spatial distribution of the protozoan parasite, *Perkinsus* sp., found in the manila clam, *Ruditapes philippinarum* in Korea. *Aquaculture* 203: 9–22

156. Park, K.-I., K.-S. Choi and J.-W. Choi. 1999. Epizootiology of *Perkinsus* sp. found in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, in Komsoe Bay, Korea. *Journal of the Korean Fisheries Society* 32: 303– 309 (in Korean with English abstract).
157. Parra-Laca, Rocío. 2010. *Urastoma* sp. y *Perkinsus marinus* en los ostiones de importancia acuícola *Crassostrea virginica* y *Crassostrea corteziensis*, ¿Coevolución o transfaunación?. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California. México. 82 pp
158. Paynter, K. T., S. K. Pierce y E. M. Burreson. 1995. Level of intracellular free amino acids used for salinity tolerance by oysters (*Crassostrea virginica*) are altered by protozoan (*Perkinsus marinus*) parasitism. *Marine Biology* 122: 67-72.
159. Perkins F.O. 1996. The structure of *Perkinsus marinus* (Mackin, Owen & Collier, 1950) Levine, 1978 with comments on taxonomy and phylogeny of *Perkinsus* spp. *J Shellfish Res* 15:67–88
160. Perkins, F. O. 1976. Zoospores of the oyster pathogen, *Dermocystidium marinum*. I. Fine structure of the conoid and other sporozoan-like organelles. *Journal of Parasitology* 62: 959-974.
161. Perkins, F. O. 1966. Life history studies of *Dermocystidium marinum*. an oyster pathogen. Ph.D. Dissertation, Florida State University. Tallahassee, Florida.
- Perkins,
162. Quast, W. D., M. A. Johns, D. E. Pitts, Jr., G. C. Matlock, and J. E. Clark. 1988. Texas oyster fishery management plan. Fishery Management Plan Series Number 1. Texas Parks and Wildlife Department, Coastal Fisheries Branch, Austin, Texas. pp. 178.

163. Qiu, L., Song, L., Xu, W., Ni, D., Yu, Y., 2007. Molecular cloning and expression of a Toll receptor gene homologue from Zhikong Scallop, *Chlamys farreri*. *Fish Shellfish Immunol.* 22(5), 451-66
164. Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F., Fitzgerald, S.W., Rhodes, C.P., 1985. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. *Int. Rev. Cytol.* 97, 183-350.
165. Ragone Calvo L. M., Calvo G. W., Burreson E. M. 2003. Dual disease resistance in a selectively bred eastern oyster, *Crassostrea virginica*, strain tested in Chesapeake Bay. *Aquaculture* 220: 69-87
166. Ray, S. M. 1966. A review of the culture method for detecting *Dermocystidium marinum*, with suggested modifications and precautions. *Proc. natl Shellfish. Ass.* 54: 55-69
167. Ray, S.M. 1953. Studies on the occurrence of *Dermocystidium marinum* in young oysters. *Proceedings of the National Shellfisheries Association* 44: 80–92.
168. Rivero A. Nitric oxide: an antiparasitic molecule of invertebrates. *Trends Parasitol* 2006;22(5):219–25.
169. Robledo JAF, Wright AC, Marsh AG, and Vasta GR 1999. Nucleotide sequence variability in the nontranscribed spacer of the rRNA locus in the oyster parasite *Perkinsus marinus*. *Journal of Parasitology* 85:650-656
170. Romestand, B., J. Torreilles and P. Roch. 2001. Production of monoclonal antibodies against the protozoa, *Perkinsus marinus*: estimation of parasite multiplication in vitro. *Aquatic Living Resources* 14: 352–357.

171. Roberts, S. B., Sunila, I., & Wikfors, G. H. (2012). Immune response and mechanical stress susceptibility in diseased oysters, *Crassostrea virginica*. *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology*, 182(1), 41–8. doi:10.1007/s00360-011-0605-z
172. Robledo J.A.F., Gauthier J.D., Coss C.A., Wright A.C., Vasta G.R., 1998, Species- specificity and sensitivity of a PCR- based as- say for *Perkinsus marinus* in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*: a comparison with the fluid thioglycollate assay. *J. Parasitol.* 84, 1237-1244.
173. Rodriguez, F. and J.I. Navas. 1995. A comparison of gill and hemolymph assays for the thioglycollate diagnosis of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) in clams, *Ruditapes decussatus* (L.) and *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve). *Aquaculture* 132: 145–152.
174. Rosenthal, P. J., K. Kim, J. H. Mckerrow, And J. H. Leech. 1987. Identification of three stage-specific proteinases of *Plasmodium fal- ciparum*. *Journal of Experimental Medicine* 166: 816-821.
175. Rawlings, N.D., Tolle, D.P., Barrett, A.J., 2004a. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem. J.* 378, 705–716
176. Rozen S., Helen J. Skaletsky (1998) Primer3. Code available at [http://www-genome.wi.mit.edu/genome\\_software/other/primer3.html](http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html).
177. Saldarriaga, J. F., M. L. McEwan, N. M. Fast, F. J. R. Taylor, and P. J. Keeling. 2003. Multiple protein phylogenies show that *Oxyrrhis marina* and *Perkinsus marinus* are early branches of the dinoflagellate lineage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 355-365

178. Sanders B.M. 1988. The role of stress protein response in physiological adaptation of marine molluscs. *Mar Environ Res* 24:207–210
179. Schott, E.J., Pecher, W.T., Okafor, F., Vasta, G.R., 2003. The protistan parasite *Perkinsus marinus* is resistant to selected reactive oxygen species. *Exp. Parasitol.* 105, 232-240.
180. Shimokawa, J., Yoshinaga, T., Ogawa, K. 2010. Experimental evaluation of the pathogenicity of *Perkinsus olseni* in juvenile Manila clams *Ruditapes philippinarum*. *Journal of invertebrate pathology*, 105(3), 347–51. doi:10.1016/j.jip.2010.08.007
181. Schultz DR, Harrington WJJr 2003. Apoptosis: Programmed cell death at a molecular level. *Semin. Arthritis Rheum.* 32: 345-369
182. Shaw, B.L., Battle, I.H., 1957. The gross microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Can. J. Zool.* 35, 325–346.
183. Shumway, S.E. 1996. Natural environmental factors. In: V.S. Kennedy, R.I.E. Newell and A.F. Eble, editors. *The Eastern Oyster Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant College, University of Maryland, College Park, Maryland. pp. 467-513.
184. Smolowitz R, Leavitt D, Perkins F. 1998. Observations of a protistan disease similar to QPX in *Mercenaria mercenaria* (hard clams) from the coast of Massachusetts. *J Invertebr Pathol* 71: 9–25
185. Song, L., Xu, C. Li, H. Li, L. Wu, J. Xiang, X. Guo 2006. Development of expressed sequence tags from the Bay scallop *Argopecten irradians irradians*. *Mar. Biotechnol.*, 8: 161–169
186. Siddall, M. E., K. S. Reece, J. E. Graves, and E. M. Burreson. 1997. ‘Total

- evidence' refutes the inclusion of Perkinsus species in the phylum Apicomplexa. Parasitology 115: 165–176.
187. Sideri M., Tsakas S., Markoutsas E., Lampropoulou M. y Marmaras M. 2007. Innate immunity in insects: surface-associated dopa decarboxylase-dependent pathways regulate phagocytosis, nodulation and melanization in medfly haemocytes. Immunology, 123, 528–537
188. Silverman GA, Whisstock JC, Bottomley SP, Huntington JA, Kaiserman D, Luke CJ, 2010. Serpins flex their muscle: I. Putting the clamps on proteolysis in diverse biological systems. J Biol Chem;285(32):24299e305.
189. Sokolova IM, Evans S, Hughes FM. 2004. Cadmium- induced apoptosis in oyster hemocytes involves disturbance of cellular energy balance but no mitochondrial permeability transition. J. Exp. Biol. 207: 3369-3380.
190. Sokolova IM. 2009. Apoptosis in molluscan immune defense. Invertebrate Survival Journal;6:49e58.
191. Soniat, T. M. 1996. Epizootiology of Perkinsus marinus disease on eastern oysters in the Gulf of Mexico. J. Shellfish Res. 15:35–43.
192. Sparks A.K., Morado JF 1988. Inflammation and wound repair in bivalve molluscs. In: Fisher W.S., editor. Disease processes in marine bivalve molluscs. Bethesda, MD, USA: American Fisheries Society. 139–152. 7.
193. Stanley, J.G. and M.A. Sellers. 1986. Species profiles: Life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (Gulf of Mexico) – American oyster. U.S. Fish Wildl. Serv. Biol. Rep. 82(11.64). U.S. Army Corps of Engineers TR EL-82-4. pp. 25
194. Stuardo, J., A. Martínez, 1975. Relaciones entre algunos factores ecológicos y



- la biología de poblaciones de *Crassostrea corteziensis* Hertlein, 1951, de San Blas, Nayarit, México. An. Centro Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. México, 2(1):89-130.
195. Sunila I., LaBanca J. 2003. Apoptosis in the pathogenesis of infectious diseases of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. Dis Aquat Org 56: 163–170
196. Tait S. W. G., Green D. R. 2008. Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut. Oncogene 27: 6452-6461, 2008.
197. Takeda K., Akira S. 2004. TLR signaling pathways. Semin Immun 16(1):3–9
198. Takeuchi O. y S. Akira. 2010. Pattern Recognition Receptors and Inflammation [Cell](#). 140(6):805-20.
199. Tall B.D., La Peyre J. F., Bier J. D., Miliotis M. D., Hanes D. E., Kothary M. H., Shah D. B. Faisal M. 1999. *Perkinsus marinus* extracellular protease modulates survival of *Vibrio vulnificus* in Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes. Applied and Environmental Microbiology 65:4261-4263
200. Tanguy, A., Guo, X., Ford, S.E. 2004. Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*C. gigas*) oysters. Gene 338(1): 121-31.
201. Thompson, R.J., R.I.E. Newell, V.S. Kennedy and R. Mann. 1996. Reproductive processes and early development. In: V.S. Kennedy, R.I.E. Newell and A.F. Eble, editors. The Eastern Oyster *Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant College, University of Maryland, College Park, Maryland. pp. 335-370.
202. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by

- geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* 3:RESEARCH0034.
203. Van Loo G, Schotte P, van Gurp M, Demol H, Hoorelbeke B, Gevaert K. 2001. Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Diff.* 8: 1136-1142, 2001
204. Vermeulen K, Van Bockstaele D, Berneman Z. 2005. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann. Hematol.* 84: 627-639.
205. Villalba, A., Reece, K. S., Camino Ordás, M., Casas, S. M., Figueras, A. 2004. Perkinsosis in molluscs: A review. *Aquatic Living Resources*, 17(4), 411–432. doi:10.1051/alr:2004050
206. Villamil L., Gomez-Leon J., Gomez-Chiarri M., 2007. Role of nitric oxide in the defenses of *Crassostrea virginica* to experimental infection with the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 968.
207. Volety, A. K. & F.-L. C. Chu. 1995. Suppression of chemiluminescence of eastern oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes by the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Dev. Comp. Immunol.* 19(2):135-142.
208. Wallace K.W. 2001. Cultivating the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. USDA, Southern Regional Aquaculture Center Pub. No. 432. 4 pp. Mississippi State University, Stoneville, MS.
209. Wang Q., Zhou, Z., Wang, L., Wang, L., Yue, F., Wang, J., & Song, L. 2013. A scallop nitric oxide synthase (NOS) with structure similar to neuronal NOS and its involvement in the immune defense. *PloS One*, 8(7), e69158. doi:10.1371/journal.pone.0069158

210. Wang, S., Peatman, E., Liu, H., Bushek, D., Ford, S. E., Kucuktas, H., ... Liu, Z. 2010. Fish & Shellfish Immunology Microarray analysis of gene expression in eastern oyster ( *Crassostrea virginica* ) reveals a novel combination of antimicrobial and oxidative stress host responses after dermo ( *Perkinsus marinus* ) challenge. *Fish and Shellfish Immunology*, 29(6), 921–929. doi:10.1016/j.fsi.2010.07.035
211. Winnebeck, E. C., Millar, C. D., & Warman, G. R. (2009). Why does insect RNA look degraded? *Journal of Insect Science (Online)*, 10(159), 159. doi:10.1673/031.010.14119
212. Wootton E. C., Dyrzynda E. A., Pipe R. K., Ratcliffe N. A. 2003. Comparisons of PAH-induced immunomodulation in three bivalve molluscs. *Aquat. Toxicol.* 65: 13-25.
213. Wright, A. C., Ahmed, H., Gauthier, J. D., Silva, A. M., & Vasta, G. R. 2002. cDNA cloning and characterization of two iron superoxide dismutases from the oyster parasite *Perkinsus marinus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 123(1), 73–77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12165391>
214. Xu, T., Yang, S., Xie, J., Ye, S., Luo, M., Zhu, Z., & Wu, X. (2012). HMGB in mollusk *Crassostrea ariakensis* Gould: structure, pro-inflammatory cytokine function characterization and anti-infection role of its antibody. *PloS One*, 7(11), e50789. doi:10.1371/journal.pone.0050789
215. Xue QG, Waldrop GL, Schey KL, Itoh N, Ogawa M, Cooper RK, 2006. A novel slow- tight binding serine protease inhibitor from eastern oyster (*Crassostrea virginica*) plasma inhibits perkinsin, the major extracellular protease of the oyster proto- zoan parasite *Perkinsus marinus*. *CompBiochemPhysiol Part B*;145:16e26
216. Xue Q, Itoh N, Schey KL, Cooper RK, La Peyre JF. 2009. Evidence indicating the existence of a novel family of serine protease inhibitors that may be involved in marine invertebrate immunity. *Fish Shellfish Immunol* 2009;27:250e9.

217. Yarnall H.A., Reece K.S., Stokes N.A., Burrenson E.M., 2000, A quantitative competitive polymerase chain reaction assay for the oyster pathogen *Perkinsus marinus*. *J. Parasitol.* 86, 827-837.
218. Yu, H., He, Y., Wang, X., Zhang, Q., Bao, Z. Guo, X. 2011. Polymorphism in a serine protease inhibitor gene and its association with disease resistance in the eastern oyster (*Crassostrea virginica* Gmelin). *Fish & shellfish immunology*, 30(3), 757–62. doi:10.1016/j.fsi.2010.12.015
219. Yu W., Chang, P., Chen, H. 2007. Fish & Shellfish Immunology Tissue expressions of nine genes important to immune defence of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*, 23, 1161–1169.
220. Zhang, L., Li, L., & Zhang, G. 2011. A *Crassostrea gigas* Toll-like receptor and comparative analysis of TLR pathway in invertebrates. *Fish & Shellfish Immunology*, 30(2), 653–60. doi:10.1016/j.fsi.2010.12.023
221. Zhang, L., Li, L., Zhu, Y., Zhang, G., & Guo, X. 2014. Transcriptome analysis reveals a rich gene set related to innate immunity in the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Marine Biotechnology (New York, N.Y.)*, 16(1), 17–33. doi:10.1007/s10126-013-9526-z
222. Zimmermann K.C., Bonzon C., Green D.R. 2001. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol. Ther.* 92: 57-70.

## ANEXO A. Cultivo de *Perkinsus marinus*

### 1. Medio de cultivo

Agua de mar artificial estéril	910.0 ml
Medio DME base (Sigma D5030)	4.2 gr
Mezcla de nutrientes F12 Ham (Sigma N6760)	2.0 gr
L-Glutamina 200mM	5.0 gr
1.0M HEPES	25.0 ml
7.5% NaHCO <sub>3</sub>	8.6 ml
Solución JLP Carbohidrato	10.0 ml
Lipido Concentrado100X (Gibco 21900-014)	10.0 ml
Suero fetal bovino inactivado (HIFBS)	20.0 ml

### 2. Preparación de soluciones

<u>Agua de mar artificial estéril</u>	
Mezcla de agua de mar sintética (Sigma S1649)	18.2 gr
Agua destilada	910.0 ml
Mezclar y filtrar a 0.22um (Corning 430626)	
Autoclavar (20 min, 121°C)	

<u>Solución JLP</u>	
Glucosa	5.0 g
Galactosa	1.0 g
Trehalosa	1.0 g
Agua destilada (Aforar)	100.0 ml

### 3. Mantenimiento del cultivo

- Realizar subcultivos de 10 a 14 días
- Colocar 100ul de cultivo en 2 ml de medio
- Incubar a 28°C por una semana
- Cuantificar en cámara neubauer (proporción 1:1 medio de cultivo y colorante rojo neutro Sigma59993)
- Colocar 10 ul de la mezcla en cámara neubauer (Fisher 0267110).

#### 4. **Activación y cuantificación de *Perkinsus marinus***

- Activación de *Perkinsus marinus*
- Tomar 50ml del cultivo en tubo Corning de 50ml
- Centrifugar 2K rpm por 15 min a 15°C
- Descartar sobrenadante
- Colocar 10 ml de AWS y resuspender cuidadosamente
- Centrifugar 2K rpm por 15 min a 15°C
- Descartar sobrenadante
- Colocar 1 ml de AWS y resuspender
- Verter AWS con PM en frasco de cultivo con 50ml de AWS
- Incubar a 28°C durante una semana
- Cuantificar y observar viabilidad

#### 5. **Cuantificación del parásito**

- Tomar 10 ml de Perkinsus y colocar en tubo de 15ml
- Centrifugar 2000rpm por 15min a 15°C
- Resuspender en 1 ml de agua de mar estéril
- Mezclar 15 ul de Perkinsus y colorante (1:1)
- Incubar a temperatura ambiente por 30 min.
- Colocar 10ul en el hematocitometro (conta por triplicado)
- Contar Perkinsus de las 4 esquinas del hematocitometro
- El total de células cuantificadas multiplicar por 2500
- El total obtenido multiplicar por el factor de dilución

Ejemplo: 940 células de una dilución 1:10

$$940 \times 2500 \times 10 = 23.5 \times 10^6$$

- Para estándares hacer diluciones seriadas  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$
- Preparar cargas para inocular a ostiones con  $1 \times 10^6$  parásitos en 100ul de agua de mar estéril.

## **6. Inoculación en organismos**

- Ostiones seleccionados se mantuvieron en agua de mar durante el proceso de inoculación
- Utilizando un esmeril pequeño (Dremel) se desgasto la concha hasta llegar al pliegue de las dos valvas
- Una vez expuesto el pliegue se introdujo una jeringa conteniendo los parasito.
- Los parásitos se depositaron en la cavidad del ostión
- El ostión se mantuvo fuera del agua por una hora y el poro fue sellado con una liga gruesa durante ese tiempo
- Después de una hora se colocaron en sus respectivas tinas

## **ANEXO B. Diagnostico de *Perkinsus marinus***

### **1. Carga parasitaria del organismo completo. Cuantificación de hipnosporas (Whole body Buden Assay)**

- Pesar el tejido del ostión completo
- Macerar completamente el tejido
- Colocar el tejido en un tubo con 10ml de medio tioglicolato RFTM (100 ul de nistatina y 5000U penicilina)
- Incubar a temperatura ambiente en oscuridad 7 días
- Centrifugar 2000rpm por 15 min
- Eliminar el medio RFTM y resuspender el tejido en 20ml de solución 2M NaOH. Aplicar vortex
- Incubar a 60°C por 2 hrs o hasta que el tejido se digiera
- Centrifugar a 2000 rpm por 15 min
- Eliminar NaOH y resuspender tejido en 25ml de agua destilada
- Centrifugar por 2000 rpm por 15 min, eliminar el agua
- Resuspender en 1 ml de agua destilada
- Centrifugar nuevamente a 2000 rpm por 15 min
- Eliminar agua y colocar 1ml de lugol 1:10
- Colocar 100ul de la muestra por triplicado en 3 filtros de 45µm filter (whatman Cat 1001-110)
- Contar hipnosporas al microscopio
- Si hay menos de 12 esporas en la alícuota no requiere diluciones y se contabiliza toda la muestra (1 ml)
- Si mas menos de 25 y mas de 12 contar 3 alícuotas
- Si es mayor a 25 esporas hacer diluciones seriadas
- Multiplicar por el factor de dilución los 3 conteos
- El total se divide por el peso del tejido y se obtiene el número de esporas por pesos fresco expresado en gramos
- Estimar grado de infección de acuerdo a la tabla de Craig (1989).



## Anexo C. Diagnostico molecular (PCR)

### 1. Extracción de ADN

- Colocar en un microtubo de 1.5 ml aproximadamente 100 mg de tejido
- Incubar en 400 µl de Buffer de lisis mas 20 µl de proteinasa K (20 mg/ml) a 65°C durante 20 minutos (homogenizar los tejidos)
- Adicionar 200 µl de NaCl saturado ~6M y agitar vigorosamente
- Colocar 10 minutos en baño de hielo, centrifugar a 10K rpm durante 15 minutos
- Transferir 500-600 µl de cada sobre-nadante a otro tubo
- Añadir a cada sobrenadante 2 volúmenes (1000 µl) de EtOH absoluto
- Invertir el tubo varias veces para precipitar el ADN. Este debe ser visible en EtOH; en ese caso transferir el ADN a un tubo con 100 µl de H<sub>2</sub>O grado molecular. Si el ADN no es visible se recomienda centrifugar 10 minutos a 13,000 rpm, y decantar el EtOH
- Agregar 1 volumen (500 µl) de EtOH al 70%, agitar en vortex y centrifugar a 13K rpm, por 5 minutos
- Decantar y poner hasta eliminar por completo el EtOH
- Diluir el ADN total en 100 µl de agua
- Cuantificar y preparar diluciones a 100ng/ul
- Almacenar -20 °C

### 2. Preparación de PCR

Agua grado molecular	8.48ul
Dntps 2.5mM	0.66ul
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	0.75ul
Buffer 10X	1.25ul
Oligo NTS-1 250ug/ml	0.13ul
Oligo NTS-2 250ug/ml	0.13ul
Taq Polimerasa 5U	0.10ul
ADN 100ng/ul	1.0ul
Total de mezcla de reacción	11.5ul

### 3. Oligos para diagnostico de *P. marinus*

NTS-1 (5'-CAC-TTG-TAT-TGT-GAA-GCA-CCC-3')

NTS-2 (5'-TTG-GTG-ACA-TCT-CCA-AAT-GAC-3')

**4. Condiciones de termociclado**

- 1 ciclo: 3 min 94°C
- 35 ciclos: 1 min 94°C, 1 min 58°C, 1 min 72°C
- indefinido: 4°C

**5. Electroforesis**

- Preparar gel de agarosa 1.5%
- Colocar 5ul de producto de PCR y 1ul de bromuro de etidio
- Aplicar 90 volts por 30 min
- Observar y documentar en luz ultravioleta
- Tamaño de producto esperado: 307pb

**6. PCR cuantitativo**

Agua grado molecular	4.95ul
Syber Green 2X	6.25ul
primer (250ug/ml)	0.15ul
primer (250ug/ml)	0.15ul
ADN (100ng/ul)	1.00ul
Volume final	12.5ul

- Preparar la mezcla por triplicado para los genes de interés y gen de referencia (correr en la misma placa)

**7. Condiciones de termociclado**

1 ciclo	50°C	2 min
1 ciclo	95°C	10 min
40 ciclos	95 °C	15 seg
	60 °C	30 seg
1 ciclo	60°C	10 min,

- Analizar los datos de acuerdo a la guía “Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR”

## **Anexo D. Procesamiento histológico e hibridación *in situ***

### **Tinción Hematoxilina-eosina**

1. Extracción del corte transversal del tejido de ostión
2. Se colocó la tejido en solución Davidson de trabajo por 24hrs
3. Se transfirió la muestra a solución Davidson stock
4. Se colocó el fragmento de gónada en histo-cassette
5. La muestra se deshidrato , el proceso de deshidratación incluyó:
6. 2 baños de una hora cada uno en alcohol al 70%
7. 2 baños de una hora cada uno en alcohol al 80%
8. 2 baños de una hora cada uno en alcohol al 95%
9. 2 baños de una hora cada uno en alcohol al 100%
10. 2 baños de una hora cada uno en xileno
11. 2 baños de una hora cada uno en parafina
12. La muestra se incluyó en el molde embebiendo con parafina
13. Se congeló para posteriormente cortar
14. Se realizaron cortes de 5µm
15. El tejido se colocó en baño con agua destilada a 37°C
16. Se realizó la colecta del tejido con un portaobjetos
17. Se desparafinó el tejido en horno a 40°C toda la noche
18. La tinción con hematoxilina-eosina, requirió:
19. 2 lavados de 5 minutos en xileno
20. Baños en alcohol 100% (2 veces)
21. Baños en alcohol 95% (2 veces)
22. Baños en alcohol 80% (2 veces)
23. Baños en alcohol 50% (2 veces)
24. Baños en agua destilada
25. Mantener en hematoxilina de 4 a 6 minutos
26. Lavar en agua para eliminar exceso
27. Mantener en eosina por 2 minutos
28. Baños en alcohol 95% (2 veces)
29. Baños en alcohol 100% (2 veces)
30. Baños en xileno (4 veces)
31. Limpiar exceso de xileno y colocar resina sintética

32. Cubrir el tejido con cubreobjetos, dejar secar a 37°C y ver al microscopio. Los cortes histológicos fueron observados para su descripción en un microscopio óptico, se hicieron lecturas a 5X y 10X. Posteriormente las imágenes fueron capturadas y documentadas en un sistema digital (Sony Exwave HAD, USA y Grabit Software, Germany).

### **Hibridación in situ (Dig DNA Labelling and detection Kit de Roche Diagnostics®)**

#### **Marcaje de la sonda**

- Mezclar 10 µl de AND (Sonda) con 20 µl de agua estéril grado molecular
- Incubar a 100° C e inmediatamente colocar en baño de hielo
- Añadir y mezclar 4 µl de Hexanucleotidos, 4 µl de dNTP's Labelling mix, 2 µl de Enzima Klenow
- Incubar a 37° C durante toda la noche
- Detener la reacción con 4 µl de EDTA 0.2 M
- Almacenar a -20° C

#### **Hibridación**

- A partir de los bloques de histología hacer cortes de 5 µm de grosor y colocarlos sobre laminillas
- Desparafinar a hidratar los tejidos; para ello las laminillas deben ser sometidas a los siguientes lavados:

<b>Lavado</b>	<b>Reactivo</b>	<b>Minutos</b>
1	Xilol	10
2	Xilol	10
3	Etanol 100%	5
4	Etanol 90%	5
5	Etanol 80%	5
6	Etanol 70%	5
7	Agua destilada	5
8	PBS 1X	5

- Drenar el líquido. Colocar las laminillas en una cámara húmeda
- Añadir a cada laminilla 400 µl de proteinaza K (10 µg/ml) en PBS.
- Cubrir con parafilm e incubar a 37°C por 10 minutos

- Lavar en PBS 1X durante 5 minutos a temperatura ambiente
- Post-fijar cada laminilla en paraformaldehído al 4% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente
- Lavar dos veces en PBS 1X
- Deshidratar las laminillas con los siguientes lavados:

Lavado	Reactivo	Minutos
1	Agua destilada	5
2	Etanol 50%	5
3	Etanol 80%	5
4	Etanol 90%	5
5	Etanol 100%	5

- Dejar secar al aire libre durante 5-10 minutos
- Preparar en tubos separados la siguiente mezcla:

Tubo	1	2 (Control negativo)
<b>Reactivos</b>	Solución de hibridación 95 µl Sonda 5 µl	Solución de hibridación 100 µl
<b>Volumen total</b>	100 µl	100 µl

- Colocar en agua hirviendo durante 5 minutos para desnaturalizar e inmediatamente poner en baño de hielo.
- Agregar 100 µl de solución a cada laminilla y cubrir con parafilm
- Incubar a 42°C durante toda la noche en cámara húmeda

### DetECCIÓN INMUNOLÓGICA

- Lavar cada laminilla dos veces con SSC 2X/SDS 1% durante 5 minutos a temperatura ambiente
- Lavar dos veces por 5 minutos con SSC 0.5X/SDS 1% a 42° C
- Lavar durante 5 minutos en buffer de lavado
- Desechar el líquido y colocar las laminillas en cámara húmeda
- Añadir 100 µl de solución de bloqueo, cubrir e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente
- Drenar el líquido y añadir 100 µl de solución de anticuerpo

- Cubrir e incubar 30 minutos a temperatura ambiente
- Lavar durante 5 minutos en buffer de lavado. Drenar el liquido y transferir a cámara húmeda
- Añadir para equilibrar 100µl de buffer de detección TRIS-HCl pH 9
- Para revelar añadir a cada laminilla 150 µl de la solución NBT/BCIP
- Esperar a que se revele el color en cámara húmeda y en oscuridad
- Lavar las laminillas con agua destilada
- Contra teñir las laminillas con café de Bismarck al 1%

## Anexo E. Extracción de ARN, síntesis de ADNc y clonación

### Extracción de ARN total (trizol)

1. El tejido fue homogenizado con 500µl de trizol
2. El homogenizado se centrifugó a 12000g por 10 min a 4oC
3. Se separó el sobrenadante a tubo limpio
4. Se incubó 5 min a temperatura ambiente
5. Se añadió 100µl de cloroformo y agitar vigorosamente
6. Se incubó por 3 min a temperatura ambiente
7. Se centrifugó a 12000g por 15 min a 4oC
8. Se transfirió la fase acuosa a tubo limpio
9. Se agregó 250µl de isopropanol
10. Se incubó la mezcla por 15 min a temperatura ambiente
11. La mezcla se centrifugó a 12000g por 10 min a 4oC
12. Se lavó el precipitado con 1 ml de etanol 70%
13. Se centrifugó por 10 min a 7500g a 4oC
14. Se retiró exceso de alcohol
15. Finalmente se resuspendió en 50 µl de agua DEPC
16. El ARN se almacenó a -80oC

### Síntesis de ADNc (Promega)

- 1) Mezclar 5 µl de RNA total con 1 µl de random primers (o 1 µl de oligo(dT)).
- 2) Incubar a 70°C 10 minutos y poner en hielo.
- 3) Mientras se incuba el RNA, preparar mezcla maestra (1X):

a.	Agua DEPC	5.3 µl
b.	5X Buffer para ImProm II	4.0 µl
c.	25 mM MgCl <sub>2</sub>	2.4 µl
d.	10 mM dNTPs	1.0 µl
e.	RNAsin	0.5 µl
f.	ImProm II	<u>0.8 µl</u>

**TOTAL..... 14 µl**

- 4) Repartir 14 µl de mezcla maestra por cada tubo que contenga el RNA + random primers (Oligo(dT)) (total 20 µl) \*recuerda recuperar el líquido del RNA con una centrifugada rápida.

- 5) Incubar a temperatura ambiente 10 minutos
- 6) Incubar a 45°C 60 minutos
- 7) Incubar a 90°C 5 minutos
- 8) Poner de inmediato en hielo
- 9) Recuperar líquido con centrifugada rápida
- 10) Almacenar a -20°C

## Clonación de Productos de PCR

### Ligación

En microtubos de 1.5 ml preparar la siguiente mezcla de ligación:

Tabla. Mezcla de ligación para el inserto de ADN y el control

Reactivos	Control vector (v)	Vector + incerto (v+i)
Buffer de Ligacion 2x	5 µl	10 µl
Vector pGEM-T Easy	1 µl	1 µl
Inserto de ADN	-	8 µl
T4 ADN Ligasa	1 µl	1 µl
H <sub>2</sub> O	3 µl	-
Volumen final	10 µl	20 µl

Dejar incubar toda la noche a 4°C

Almacenar a -20°C

### Transformación

Añadir 50 ml de cultivo de bacterias *E coli* DH5-α5 a las mezclas de ligación (v+i y v)

Colocar 30 minutos en baño de hielo

Enseguida incubar en un baño maria a 37°C por 20 segundos

Inmediatamente colocar 2 minutos en baño de hielo

Añadir 1.5 ml de medio SOC en tubos e

Inocular las bacterias transformadas en los tubos con medio

Incubar 1 h en agitación a 37°C

Centrifugar 5 minutos a 8000 rpm

Descartar el sobrenadante

Resuspender las bacterias con el excedente del sobrenadante



Tomar 10  $\mu$ l

Tabla. Mezcla para transformación

	<b>Tubo 1 (v+1)</b>	<b>Tubo 2 (v)</b>
<i>E coli</i> DH5- $\alpha$ 5	50 $\mu$ l	25 $\mu$ l
Mezcla de ligación	4 $\mu$ l	2 $\mu$ l

### **Inoculación de colonias en medio LB-amp (50 mg/ml)**

Colocar 30  $\mu$ l de ampicilina en 25 ml de LB

Verter 2 ml de LB-amp en tubos de ensaye de 15 ml

Seleccionar colonias aisladas

Levantar las colonias con asas microbiológicas e inocularlas en LB-amp

Incubar toda la noche en agitación (240 rpm) a 37°C

### **Extracción de plásmidos Minipreps (Promega®)**

Transferir 1.5 ml de cultivo bacteriano a un tubo limpio

Centrifugar a 12000 rpm por 1 minuto

Desear el sobrenadante y añadir 250  $\mu$ l de solución de resuspensión (GTE) y se resuspendió con vortex

Añadir 250  $\mu$ l de solución de lisado (NaOH+ SDS), mezclar

Incubar a temperatura ambiente de 2 a 5 minutos

Añadir 10  $\mu$ l de proteinaza alcalina, mezclar

Incubar 5 minutos a temperatura ambiente

Añadir 350  $\mu$ l de solución neutralizadora (Acetato de potasio)

Centrifugar a 12000 rpm durante 10 minutos

Transferir sobrenadante a columnas

Centrifugar a 12000 rpm por 1 minuto

Descartar el lavado del tubo colector

Añadir 750  $\mu$ l de solución de lavado

Centrifugar a 12000 rpm por 1 minuto

Descartar el lavado

Añadir 250  $\mu$ l de solución de lavado

Centrifugar a 12000 rpm durante 2 minutos

Descartar el lavado

Centrifugar a 12000 rpm por 1 minuto

Colocar las columnas en un tubo limpio

Eluir con 100  $\mu$ l de agua libre de nucleasas e incubar 1 minuto

Centrifugar a 12000 rpm por 2 minutos

Almacenar los productos a -20°C

### **Digestión de los plásmidos con EcoRI (Promega®)**

Para cada clon se preparar:

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad</b>
Agua	7.2 $\mu$ l
10x buffer	1.0 $\mu$ l
EcoRI	0.8 $\mu$ l
Volumen total	9.0 $\mu$ l

Colocar en cada tubo 9  $\mu$ l de mezcla mas 1  $\mu$ l de ADN

Incubar durante 2 horas a 37°C

Preparar un gel de agarosa al 2%

Colocar en las pozas la mezcla mas el buffer de carga

Correr a 70V durante 40 minutos

## Anexo F (listado de oligos)

	Nombre	Acceso	Secuencia 5' - 3'	Temp.	Producto
NTS1	Perkinsus marinus		cac ttg tat tgf gaa gca ccc	58	304pb
NTS2	Perkinsus marinus		ttg gtg aca tct cca aat gac	58	
PA690F	Perkinsus marinus		atg cta tgg ttg gct tgc gga cc	60	
PA690R	Perkinsus marinus		gta gca agc cgt aga aca gc	60	
PerkITS1R	Perkinsus ITS		gagatgggatcyccgcttgttt	60	532pb
PerkITS1R	Perkinsus ITS		gaacgcgtgatcraggaacacg	60	
CASP1F	caspase-1 mRNA	HQ425703	acagacagcaccgagttct	60	585pb
CASP1R	caspase-1 mRNA	HQ425703	caggagcattgggtgagtt	60	585pb
FASF	FAS-associating death domain-containing protein mRNA,	HQ425699	tgggaaatitggagacgag	60	403pb
FASR	FAS-associating death domain-containing protein mRNA,	HQ425699	tatccatccgtcactcca	60	403pb
CASP2F	caspase-2 mRNA,	HQ425705	gcagggtcctcatcaat	60	604pb
CASP2R	caspase-2 mRNA,	HQ425705	gtcagaaaccaggaccgta	60	604pb
SODmnF	Manganese-superoxide dismutase mRNA,	EU420128	ccatcacagcaaacatcacc	60	329pb
SODmnR	Manganese-superoxide dismutase mRNA,	EU420128	agtgggctgcctgtcatag	60	329pb
SODCuZnF	CuZnSOD mRNA,	HM125581	tggctgtacaagtgtggag	60	210pb
SODCuZnR	CuZnSOD mRNA,	HM125581	tcatcaacatcgcatgaat	60	210pb
TollF	toll-like receptor 1 mRNA,	HQ174216	gggtgaatcagattgcgttt	60	666pb
TollR	toll-like receptor 1 mRNA,	HQ174216	tgcataacgaaccaagatgc	60	666pb
SPI1F	CVS11 serine protease inhibitor 1	DQ092546	taatgaactccagtgcgcaag	60	163pb
SPI1R	CVS11 serine protease inhibitor 1	DQ092546	actgtccacacaatgccaga	60	163pb
SPI2F	CVS12 mRNA for serine protease inhibitor 2,	AB468967	cgatggagattgcaagaaca	60	180pb
SPI2R	CVS12 mRNA for serine protease inhibitor 2,	AB468967	aagcaacgcatttagcatc	60	180pb
EF1aF	EF1-alpha mRNA for elongation factor 1 alpha,	AB122066	caccaacatcaccactgag	60	489pb
Ef1aR	EF1-alpha mRNA for elongation factor 1 alpha,	AB122066	cagcctctcaacctccttg	60	489pb
ActinosF	beta-actin gene	X75894, AF026063, AB071191, EU234531, DQ437570	gct atg tac gtc gcc atc c	60	358pb
ActinosR	beta-actin gene	X75894, AF026063, AB071191, EU234531, DQ437570	tgg tga tga cct gac cgt c	60	358pb
TNFF	TNF-alpha factor	EU249541	ccaacaagtctgcaacag	56	291pb
TNFR	TNF-alpha factor	EU249541	tagattctgctgtagcgcc	56	291pb
NOSF	nitric oxide synthase-like	GQ844865	gtttacggaggtttgccaga	60	449pb
NOSR	nitric oxide synthase-like	GQ844865	cgtaatgtgacgcctact	60	449pb
PERNF	Cu/Zn superoxide dismutase (SOD) domain	AB269930	cacgagtacggagacatgga	60	176pb
PERNR	Cu/Zn superoxide dismutase (SOD) domain	AB269930	attccgtcgtgtgccaa	60	176pb
TNFqF	TNF-alpha factor (TNF)	EU249541	catccaatattcggaagtg	60	131pb

TNFqR	TNF-alpha factor (TNF)	EU249541	cacacagaacgggatcagacaac	60	131pb
FASqF	FAS-associating death domain-containing protein mRNA	HQ425699.1	ggagtgacggatggtgatatg	60	128
FASqR	FAS-associating death domain-containing protein mRNA	HQ425699.1	aactattctcccctgtcaaac gtttgacagggcgagaatagtt	60	128
IAPF	Crassostrea gigas inhibitor of apoptosis protein mRNA	HQ425701	acagccgaccagtaacatcc	60	500pb
IAPR	Crassostrea gigas inhibitor of apoptosis protein mRNA	HQ425701	caggttcccagttacgcaat	60	
Casp1qF	Crassostrea gigas caspase-1 mRNA, complete cds	HQ425703	attaatgacctgatggagccc	60	128
Casp1qR	Crassostrea gigas caspase-1 mRNA, complete cds	HQ425703	tctgcgacattcatatccacg	60	128
Casp2qF	Crassostrea gigas caspase-2 mRNA	HQ425705.1	cggcaaaacagtctccatag	60	134
Casp2qR	Crassostrea gigas caspase-2 mRNA	HQ425705.1	ctctttcacaccttctcttttg	60	134
SODmnqF	manganese-superoxide dismutase mRNA	<a href="#">HM125580.1</a> <a href="#">GQ229480.1</a> <a href="#">EU420128.1</a>	gccttaagacttgatcctgg	60	101
SODmnqR	manganese-superoxide dismutase mRNA	<a href="#">HM125580.1</a> <a href="#">GQ229480.1</a> <a href="#">EU420128.1</a>	cagctccatcctgatccttg	60	101
SODCuqF	Crassostrea (ariakensis, gigas, hongkongensis) CuZnSOD mRNA	<a href="#">HM125581.1</a> <a href="#">DQ471871.1</a> <a href="#">AJ496219.1</a>	agcccacttaacccttc	60	119
SODCuqR	Crassostrea (ariakensis, gigas, hongkongensis) CuZnSOD mRNA	<a href="#">HM125581.1</a> <a href="#">DQ471871.1</a> <a href="#">AJ496219.1</a>	ctgtgatactgatttggcgac	60	119
HSP70qqF	Crassostrea gigas (hsp70) mRNA	<a href="#">AF144646</a> <a href="#">AY172024.1</a> <a href="#">DQ173923.1</a>	cagcaagccattggaatagat	60	100pb
HSP70qqR	Crassostrea gigas (hsp70) mRNA	<a href="#">AF144646</a> <a href="#">AY172024.1</a> <a href="#">DQ173923.1</a>	ttcggttacccgatcgcttg	60	100pb
TollqF	Crassostrea gigas isolate mollgen 29159 toll-like receptor 1 mRNA,	HQ174216.1	atgaccacgagtgagggaac	60	110pb
TollqR	Crassostrea gigas isolate mollgen 29159 toll-like receptor 1 mRNA,	HQ174216.1	cttcatcccttccgcatcat	60	110pb
NOSqF	nitric oxide synthase-like	GQ844865	cggctccagcattctgttt	60	150pb
NOSqR	nitric oxide synthase-like	GQ844865	accccatcttctctgcaatg	60	150pb
Hsp70-2qF	Crassostrea gigas partial hsp70 gene for heat shock protein 70.	AJ318882	gggaaggtggaatcatcg		160
Hsp70-2qR	Crassostrea gigas partial hsp70 gene for heat shock protein 70.	AJ318882	tctgccgattagacgcttg		160
SPI-1RaceF			tgaactccagtcgcaagtggtta	70°C	154
SPI-1RaceR			cacacaatgccagaagccgtcac	70°C	154

SPI-2RaceF			gttacacagccgccgagacatgc	70°C	184
SPI-2RaceR			cagtccatcttccgtgtcttcca	70°C	184
VTGlf_F	VTG Long Fragment degenerate	JN638064, AM943022 AB055960	agtgttctgtgtaaatgtgaa	60	877PB
VTGlf_R	VTG Long Fragment degenerate	JN638064, AM943022 AB055960	ccayttagcgacraaat	59	877PB
VTGqF	VTG qPCR	AB084783	cgaggagaaatggaatgga	60	169pb
VTGqR	VTG qPCR	AB084783	ccagcctggcaatttct	60	169pb
28SqF	Gen de referencia	AY145400, AY632554 AY632553, AY632552, AF137051, AF137049, AB110095, Z29548, Z29545 AY632555	gatgctgggaactgtggtg	60	132
28SqR	Gen de referencia	AY145400, AY632554 AY632553, AY632552, AF137051, AF137049, AB110095, Z29548, Z29545 AY632555	cttgggctgcatttcaa	60	132