



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE CATEPSINA B Y SU INHIBIDOR
(CISTATINA B) EN ABULÓN AZUL (*Haliotis fulgens*) Y ABULÓN
AMARILLO (*Haliotis corrugata*)**

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales

(Orientación en Biotecnología)

P r e s e n t a

Cintya Alejandra Nevárez López.

La Paz, Baja California Sur, Abril del 2014.

“Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas”

-Marie Curie-

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 15:00 horas del día 02 del Mes de Abril del 2014, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

“Estudio De La Expresión De Catepsina B Y Su Inhibidor (Cistatina B) En Abulón Azul (*Haliotis fulgens*) Y Abulón Amarillo (*Haliotis corrugata*)”

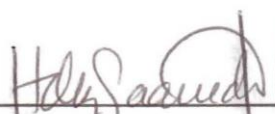
Presentada por el alumno:

Cintya Alejandra Nevárez López

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Biotecología**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA


 Dra. Norma Y. Hernández Saavedra
 DIRECTOR DE TESIS


 Dr. J. Arturo Sánchez Paz
 CO-TUTOR


 Dra. Elisa Serviere Zaragoza
 CO-TUTOR


 DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
 DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CONFORMACIÓN DE COMITÉS

Director de tesis

Dra. Norma Y. Hernández Saavedra CIBNOR, Campus La Paz.

Comité Tutorial

Dra. Norma Y. Hernández Saavedra CIBNOR, Campus La Paz.

Dra. Elisa Serviere Zaragoza CIBNOR, Campus La Paz.

Dr. Jose Arturo Sanchez Paz CIBNOR, Campus Hermosillo.

Comité Revisor de Tesis

Dra. Norma Y. Hernández Saavedra CIBNOR, Campus La Paz.

Dra. Elisa Serviere Zaragoza CIBNOR, Campus La Paz.

Dr. Jose Arturo Sanchez Paz CIBNOR, Campus Hermosillo.

Jurado de Examen

Dra. Norma Y. Hernández Saavedra CIBNOR, Campus La Paz.

Dra. Elisa Serviere Zaragoza CIBNOR, Campus La Paz.

Dr. Jose Arturo Sanchez Paz CIBNOR, Campus Hermosillo.

Suplente

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes CIBNOR, Campus La Paz.

**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE CATEPSINA B Y SU INHIBIDOR
(CISTATINA B) EN ABULÓN AZUL (*Haliotis fulgens*) Y ABULÓN AMARILLO
(*Haliotis corrugata*)**

Nevárez-López, C.A.

En la península de Baja California, los organismos del género *Haliotis* o comúnmente llamados abulones, representan una de las pesquerías más importantes y antiguas de la región por las ganancias que genera; dentro de las especies que se explotan en la península, se encuentra *Haliotis fulgens* y *H. corrugata*. Al igual que otras pesquerías, esta actividad ha presentado etapas que han puesto en riesgo su permanencia, principalmente mortalidades masivas ocasionadas por diversos factores, entre ellos patógenos como *Xenohalotis californiensis* (agente causal del Síndrome de deshidratación en abulones (SDA)). Sin embargo las células eucariotas tienen diversos mecanismos para contrarrestar los ataques de agentes invasores, como la degradación de estos por fagocitosis en los lisosomas mediado por enzimas principalmente de tipo catepsinas, aunque estas a su vez están reguladas por inhibidores que previenen la autólisis como las cistatinas. El presente trabajo tuvo como objetivo el análisis transcripcional de catepsina B y cistatina B en *H. fulgens* y *H. corrugata*. Se colectaron muestras de hemolinfa de ambas especies de organismos “sanos” y de organismos con sintomatologías por SDA, se realizaron extracciones de RNA y síntesis de ADNc de cada una de las muestras, una vez obtenido ADNc de calidad, se realizó PCR punto final para los genes catepsina B (*catB*), cistatina B (*cystB*), Succinato deshidrogenasa (*sdh*), proteína ribosomal L5 (*rpl5*), factor de elongación 1 α (*fel1 α*), proteínas de shock térmico 70 y 90 (*hsp70* y *hsp90*), los amplicones se enviaron a secuenciar y las secuencias obtenidas se analizaron en Blastn, posteriormente se realizó PCR en tiempo real. Se identificaron por secuenciación, para ambas especies, cinco de los siete genes a analizar. Para la especie *H. fulgens* la expresión del gen *cistB* fue mayor que la expresión del gen *catB* tanto en organismos sanos como en organismos con SDA presentando diferencias significativas. Para la especie *H. corrugata*, la expresión del gen *catB* fue mayor que la expresión del gen *cistB* en las dos condiciones aunque sin diferencias significativas. El gen de catepsina B podría tener otras funciones además de participar en la fagocitosis y para medir la actividad de los transcritos el gen de cistatina B juega un papel crucial.

Palabras clave: catepsina B, cistatina B, *Haliotis*, abulón

STUDY EXPRESSION OF CATHEPSIN B AND THEIR INHIBITOR (CYSTATIN B) IN BLUE ABALONE (*Haliotis fulgens*) AND YELLOW ABALONE (*Haliotis corrugata*)

In Baja California, organisms of the genus *Haliotis*, commonly termed abalone, are one of the oldest and most important fisheries in the region by revenues generated; within the exploited species in the peninsula, *Haliotis fulgens* and *H. corrugata* are among the most important. Like other fisheries, this activity is highly exposed to the risks of adverse events, mainly mass mortalities caused by various factors, including pathogens like *Xenohaliotis californiensis* (causal agent of the dehydration syndrome in abalone (DSA)). However, eukaryotic cells have evolved numerous complex and efficient defense mechanisms against harmful agents, such as degradation by lysosomal hydrolytic enzymes, mainly by cathepsin types, which are in turn regulated by inhibitors, as cystatins, that prevent autolysis. This study aimed at analyzing the global expression of the genes encoding both cathepsin B and cystatin B in *H. fulgens* and *H. corrugata*. Hemolymph samples of both species of "healthy" organisms and organisms exhibiting DSA clinical signs were collected, RNA was isolated and cDNA from each sample was synthesized. Conventional end-point PCR was carried out to amplify the genes encoding for cathepsin B (catB), cystatin B (cystB), succinate dehydrogenase (sdh), ribosomal protein L5 (rpl5), elongation factor 1 α (ef1 α), and the heat shock proteins 70 and 90 (hsp70 and hsp90). Samples were sequenced and the resulting sequences were analyzed by BLAST. Subsequently, a real-time PCR assay was performed to evaluate the expression levels of catB and cystB genes in both species. In *H. fulgens* the expression of cystB was significantly higher than that of catB in healthy organisms when compared with organisms with DSA, while in *H. corrugata*, catB gene expression was higher than the expression of the gene cystB in two conditions but without significant differences. It is proposed here that Cathepsin B may have additional functions to participating in phagocytosis, and to measure the activity of the gene transcripts of cystatin B plays a crucial role.

Key words: cathepsin B, cystatin B, *Haliotis*, abalone.

DEDICATORIA

A mi madre, por enseñarme a soñar y luchar por mis sueños

A mi padre, por creer en mí y apoyarme incondicionalmente

A mis hermanos, por su admiración y su amor incondicional

A mi mejor amigo y amor, Manuel Lastra

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Norma Y. Hernández-Saavedra por su amistad, confianza, paciencia y todo el apoyo para que se realizara con éxito este trabajo.

A mi comité revisor Dra. Elisa Serviere Zaragoza y Dr. Arturo Sánchez Paz por todo el apoyo brindado para la realización exitosa de este trabajo.

Al CIBNOR por permitirme el uso de sus instalaciones para realizar este trabajo.

Al CONACYT por el apoyo económico otorgado mediante la beca No. 322655.

A Posgrado por el apoyo económico otorgado para continuar el trabajo, así como el apoyo para mi estancia en la Unidad Hermosillo.

A Horacio, Letty, Claudia, Tania y Osvelia por todo su apoyo.

Al personal de biblioteca, Esther Ojeda y Ana María Talamantes, por todo el apoyo brindado durante esta etapa.

A la técnico Delia Rojas, por todo el apoyo en el trabajo de laboratorio y todos sus tips para resolver los problemas presentados en el mismo.

Al Dr. Fernando García por sus sugerencias y apoyo brindado en el conocimiento de las proteasas.

A la técnico María de los Angeles Navarrete del Toro por el apoyo y estancia en el laboratorio de Bioquímica, así como su enseñanza en el conocimiento de las proteínas.

A mis amigos y compañeros de posgrado en Guaymas, Susana, Edgar y Memo por todos los momentos de desveladas, fines de semana y horas extras haciendo tareas, sin ustedes no hubiera sido tan divertido.

A mis amigos, confidentes y compañeros de aventuras, Edgar, Luis y Norma G., por enseñarme que la playa es más que irse a asolear, por apoyarme y darme ánimos para seguir. Sin ustedes la maestría y La Paz, hubieran sido muy aburridas. Se quedaron con un pedasito de mi corazón.

A mi amiguita Delia, por ser mi confidente y apoyarme en los momentos difíciles, por ser mi hermanita de La Paz.

A Jehú por su amistad y apoyo cuando todo se veía tan difícil.

A Arturo Sierra, por todo el apoyo, enseñanza y comentarios para este trabajo.

A mi amiga y técnico Tania Enriquez, por todo el apoyo brindado durante mi estancia en Hermosillo, las horas de café y confidencias.

A mis compañeros del L4: Angelica, Reyna, Matus, Abel, Norma, Jehú, Paloma y Karina, por todos los momentos que hemos pasado.

A todas las personas que no mencione pero que me ayudaron a la realización exitosa de este trabajo.

CONTENIDO

DEDICATORIA	VII
AGRADECIMIENTOS	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	5
2.1 Generalidades.....	5
2.2 Las proteasas y el sistema inmune.....	11
2.3 Sistema inmune en invertebrados: el papel de catepsina B y cistatina B.	16
3. JUSTIFICACIÓN	21
4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVO GENERAL.....	22
5.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS	22
6. MATERIALES Y MÉTODOS	23
6.1 Obtención de muestras.....	23
6.2 Extracción de ARN	23
6.3 Síntesis de ADN complementario (ADNc)	24
6.4 Reacción en cadena de la polimerasa punto final (PCR).....	25
6.5 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo-real cuantitativa (qPCR)	26

6.6 Validación de genes constitutivos.....	27
6.7 ANOVA de 2 vías.....	28
7. RESULTADOS	29
7.1 Muestras biológicas	29
7.2 Amplificación del gen de la catepsina B y del gen del inhibidor cistatina B por RT-PCR.....	30
7.3 QPCR.....	35
7.4 ANOVA 2 vías.....	46
8. DISCUSIONES	50
9. CONCLUSIONES	55
10. BIBLIOGRAFÍA	57

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Ciclo de vida de los organismos del género <i>Haliotis</i>	5
Figura 2. Proceso de infección de <i>X. californiensis</i> en <i>Haliotis</i> spp	8
Figura 3. Procesos de degradación en la célula mediados por el lisosoma	13
Figura 4. Mecanismos de hidrólisis de catepsinas cisteínicas	14
Figura 5. Formación del complejo enzima-inhibidor de catepsina y cistatina	15
Figura 6. Esquematación de la relación entre los principales procesos inmunes o proteínas del sistema inmune en invertebrados	17
Figura 7. Etapas de la fagocitosis que termina en una respuesta inflamatoria	18
Figura 8. Mapa geográfico de la localidad muestreada	29
Figura 9. Perfil electroforético de ARN de hemolinfa de <i>H. fulgens</i> y <i>H. corrugata</i>	32
Figura 10. Productos de PCR usando como templado 100 ng de ADNc de hemolinfa de <i>H. fulgens</i> y <i>H. corrugata</i>	33
Figura 11. Alineamiento de secuencias de ADNc de catepsina B	34
Figura 12. Alineamiento comparativo de secuencias de ADNc de cistatina B	35
Figura 13. Expresión génica de <i>catB</i>	36
Figura 14. Curva estándar de la expresión génica de <i>catB</i>	37
Figura 15. Curva estándar de la expresión génica de <i>cistB</i>	37
Figura 16. Curva estándar de la expresión génica de <i>sdh</i>	38
Figura 17. Curva estándar de la expresión génica de la <i>rpl5</i>	38
Figura 18. Curva estándar de la expresión génica del <i>fe1a</i>	39
Figura 19. Representación gráfica de los cambios de expresión en el gen <i>catB</i>	42

en hemolinfa de *H. fulgens*. ($P < 0.05$)

PÁGINA

Figura 20. Representación gráfica de los cambios de expresión en el gen <i>cistB</i> en hemolinfa de <i>H. fulgens</i> . ($P < 0.05$)	42
Figura 21. Representación gráfica de los cambios de expresión en genes <i>catB</i> y <i>cistB</i> en hemolinfa de <i>H. fulgens</i> de acuerdo a su condición. ($P < 0.05$)	43
Figura 22. Representación gráfica de los cambios de expresión en el gen <i>catB</i> en hemolinfa de <i>H. corrugata</i> . ($P < 0.05$)	44
Figura 23. Representación gráfica de los cambios de expresión en el gen <i>cistB</i> en hemolinfa de <i>H. corrugata</i> . ($P < 0.05$)	45
Figura 24. Representación gráfica de los cambios de expresión en genes <i>catB</i> y <i>cistB</i> en hemolinfa de <i>H. corrugata</i> de acuerdo a su condición. ($P < 0.05$)	46

LISTA DE TABLAS

	PÁGINA
Tabla I. Componentes importantes en el sistema de defensa inmune de invertebrados	2
Tabla II. Número y tipo de secuencias reportadas en la base de datos del NCBI para algunas especies de <i>Haliotis</i>	20
Tabla III. Lista de reactivos utilizados para realizar transcripción reversa	24
Tabla IV. Lista de oligos para PCR y qPCR	25
Tabla V. Relación de muestras de <i>H. fulgens</i> y <i>H. corrugata</i>	30
Tabla VI. Concentraciones de ARN y ADNc de hemolinfa de <i>H. fulgens</i> y <i>H. corrugata</i>	31
Tabla VII. Promedio de número de copias para cada gen por set de muestras	39
Tabla VIII. Análisis estadístico para <i>sdh</i> , <i>rpl5</i> y <i>fe1α</i> con el programa 41 Normfinder	40
Tabla IX. Análisis estadístico para <i>sdh</i> , <i>rpl5</i> y <i>fe1α</i> con el programa Bestkepper	40
Tabla X. Análisis de la expresión del gen <i>catB</i> en muestras de ADNc de hemolinfa de organismos sanos y enfermos de <i>H. fulgens</i> y <i>H. corrugata</i> , mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_p}$	41
Tabla XI. Análisis de la expresión del gen <i>cistB</i> en muestras de ADNc hemolinfa de organismos sanos y enfermos de <i>H. fulgens</i> y <i>H. corrugata</i> , mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_p}$	41
Tabla XII. ANOVA de 2-vías de <i>H. fulgens</i> entre <i>catB</i> y <i>cistB</i>	49
Tabla XIII. Análisis <i>post hoc</i> . Prueba de Tukey para <i>H. fulgens</i> . Error: Entre promedios de cuadrados = 0.55183	49
Tabla XIV. ANOVA de 2-vías de <i>H. corrugata</i> entre <i>catB</i> y <i>cistB</i>	49

1. INTRODUCCIÓN

La descripción y conocimiento de la fisiología general de los diversos componentes del sistema inmune de organismos marinos de interés comercial, como los moluscos, es una aportación muy importante para establecer estrategias que contrarresten los efectos devastadores de diversos agentes patógenos que han causado pérdidas económicas considerables a la industria de sus respectivos cultivos (Romero et al., 2012).

En estudios diseñados para dilucidar los mecanismos que pueden influir en la susceptibilidad y/o no susceptibilidad de los moluscos a microorganismos patógenos, es vital considerar la forma en la que funcionan los mecanismos de defensa de estos organismos al ser retados con sustancias no propias. Esta información es importante, ya sea para el desarrollo de agentes potenciales de control biológico contra especies de moluscos no deseables, o para la posible prevención de enfermedades microbianas que afectan la producción de moluscos de importancia comercial (Cheng, 1975). Además, habrá que considerar los efectos que pueden causar condiciones ambientales anómalas (por ejemplo, el impacto del cambio climático), por lo que es de suma importancia desarrollar métodos de diagnóstico ante enfermedades y estrategias terapéuticas para los organismos, con particular énfasis en aquellos que son cultivables.

Los invertebrados, organismos que carecen de un sistema inmune adaptativo, han desarrollado otros sistemas de defensa contra bacterias, hongos o virus patógenos: el llamado sistema inmune innato (Iwanaga y Luel-Lee, 2005). En primer lugar, el organismo distingue entre lo propio y lo ajeno, en segundo lugar, éste monta una respuesta defensiva que puede matar o inhabilitar al agente extraño invasor, y por último, un reconocimiento y eliminación sus propias células dañadas o enfermas. Estos requisitos conducen a los tres componentes esenciales de la inmunidad innata: 1) fagocitosis (mediada por células); 2) activación de las respuestas humorales que conducen a la opsonización, melanización, y coagulación (libre de células), y 3) producción de compuestos humorales antimicrobianos (sin células) (Mydlarz et al., 2006).

La principal característica de las células del sistema inmune es la síntesis y liberación de efectores moleculares que orquestan o implementan la respuesta ante una amenaza inmune (Bird et al., 2009). Dentro de dichos efectores se incluyen importantes elementos de defensa (Tabla I), que ayudan a mantener la homeostasis en los organismos (Iwanaga y Luel-Lee, 2005).

Tabla I. Principales componentes del sistema de defensa inmune de invertebrados (Tomado de Iwanaga y Luel-Lee, 2005).

1	Sistema de coagulación en hemolinfa
2	Activación del sistema pro-fenoloxidasa (pro-PO)
3	Sistema complementario de lectina
4	Sistema aglutinina-lectina
5	Sistema antibacterial, antifúngico y antiviral mediado por receptores tipo Toll y proteínas de enlace a peptidoglicanos (PGBP)
6	Sistema productor de oxígeno reactivo
7	Sistema de fagocitosis

Se sabe que en invertebrados, durante un proceso infeccioso, una de las primeras respuestas del sistema inmune celular es el fenómeno de degranulación de los hemocitos, una vez que los gránulos se encuentran en el plasma, se liberan enzimas proteolíticas vía desestabilización de membrana; estas enzimas contribuyen a destruir el material extraño (Li et al., 2010a).

Dentro del sistema de fagocitosis las proteasas son los constituyentes más comunes en los compartimentos endolisosomales, y tienen importantes roles en la respuesta inmune, tanto intracelularmente como en el medio extracelular (Bird et al., 2009). Los endosomas y lisosomas albergan principalmente cisteín- y aspártico-proteasas ácidas que apoyan el procesamiento y activación de antígenos, citocinas e integrinas, entre otras funciones del sistema inmune (Colbert et al., 2009).

Si bien la información sobre la respuesta inmune de los moluscos del género *Haliotis* es escasa aún, se considera que la actividad proteolítica es un importante componente del sistema de defensa, ya que estos organismos presentan un sistema de circulación abierto

donde las enzimas que participan en la fagocitosis también poseen funciones digestivas al estar en contacto directo con todo el tracto digestivo (Tisca y Mosca, 2004). Sin embargo, la descripción de la participación de dicha actividad proteolítica solamente ha considerado su intervención fisiológica y bioquímica en el proceso de digestión, sin considerar su participación como un componente del sistema de defensa contra patógenos. Por ejemplo, se ha descrito ampliamente la presencia de proteasas, tripsinas, quimotripsinas en el tracto digestivo de organismos adultos de *Haliotis fulgens*, (Serviere-Zaragoza et al., 1997) y carboxipeptidasa A (Hernández-Santoyo et al., 1998), mientras que en organismos juveniles se han identificado una proteinasa ácida, tripsina, quimotripsina y aminopeptidasas (García-Carreño et al., 2003). Sin embargo, los estudios sobre la expresión de dichas enzimas como parte de la respuesta inmune aún son escasos (Premachandra et al., al., 2012; Qiu et al., 2013).

Si consideramos que los miembros del género *Haliotis* son organismos sensibles al estrés ambiental (por lo que son reconocidos como buenos bio-indicadores en los ambientes (por lo que son reconocidos como buenos bio-indicadores en los ambientes marinos) (Hunt y Anderson, 1989), y que algunos patógenos, posiblemente dependientes de cambios ambientales como el protozooario *Xenohalotis californiensis*, merman significativamente tanto las poblaciones silvestres como cultivadas, el estudio de los mecanismos de regulación de algunas enzimas que participan en el sistema inmune son de suma importancia. Esta información permitirá entender algunos mecanismos de respuesta inmune del abulón ante un proceso infeccioso.

En la última década, la información relacionada al análisis de la expresión génica se ha incrementado de forma importante debido a la gran cantidad de genomas que se han secuenciado, lo que ha facilitado la detección de genes implicados en procesos inmunológicos de gran interés tanto en invertebrados como en vertebrados (Pessino y Marteloto, 2004). El estudio de la regulación biológica está muy correlacionado con los ensayos de cuantificación que pueden relacionar proteínas o ARN (ácido ribonucleico) (Thellin et al., 1999).

En 1992, a casi 10 años de la invención de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), la aplicación de fluorescencia en esta técnica durante los ciclos térmicos fue relacionada directamente con el número de copias de ADN (ácido desoxirribonucleico), lo que dio origen a la técnica de PCR tiempo-real (qPCR). Comparada con la PCR convencional (PCR punto final) donde al concluir la amplificación el producto se corre en un gel para detectar productos específicos, en el qPCR, se combina la amplificación del ADN y la detección inmediata de los productos en un mismo tubo, lo que disminuye los riesgos de contaminación por manipulación, y permite la obtención de resultados cuantitativos (Kubista et al., 2006).

En el presente trabajo se aborda el análisis de la expresión de los transcritos que codifican la catepsina B y su inhibidor, en *Haliothis fulgens* y *H. corrugata* para contribuir al entendimiento de la respuesta inmune.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades

Los moluscos genéricamente llamados abulones, pertenecen al Phylum Mollusca, clase Gastrópoda, familia Haliotidae y género *Haliotis*. Son comúnmente llamados “orejas de mar” por la forma espiral aplanada de su concha, la cual brinda protección al cuerpo. Tienen una línea de poros respiratorios a lo largo del espiral que permite que el agua bañe las branquias para la absorción de oxígeno y el lavado de desechos corporales (Ray y Price, 2007). Su ciclo de vida incluye una fase larval pelágica trocófora, que desarrolla progresivamente una estructura ciliada denominada *velum*, posteriormente presentan un estadio de larva *veliger* que es típico de moluscos, y es la forma que finalmente se adhiere finalmente al substrato (Fig. 1) (Leighton, 1974).

Este grupo de organismos habita desde zonas intermareales hasta profundidades de aproximadamente 165 m (dependiendo de la especie), y se fijan a las rocas mediante un pie muscular que es rodeado por un *epipodium* o manto que tiene pequeños tentáculos y estructuras sensoriales. Además, estos organismos presentan una cabeza, un par de ojos, una boca y un largo par de tentáculos; los órganos internos están acomodados en forma de espiral dentro de la concha (Cox, 1962).

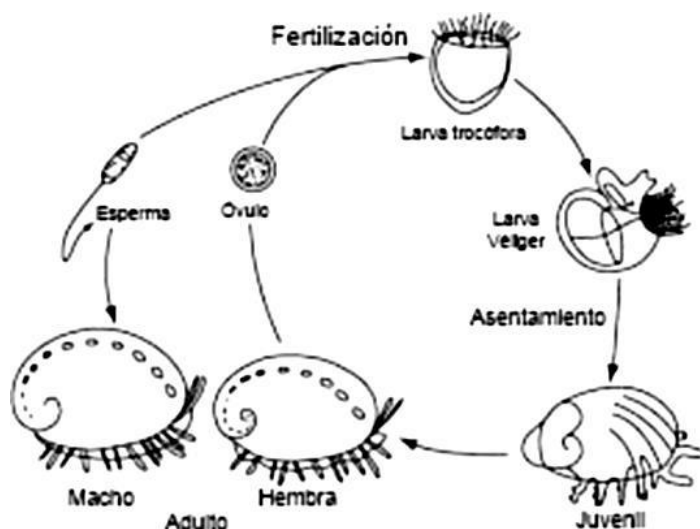


Figura 1. Ciclo de vida de los organismos del género *Haliotis* (Tomado de <http://www.fishtech.com/facts.html>).

Son organismos dioicos, sin dimorfismo sexual externo, aunque se han reportado organismos hermafroditas (León et al., 1992). En adultos, la gónada tiene una capa de tejido que cubre la glándula digestiva conformando el apéndice cónico, se presenta con una coloración gris-verde en hembras y color crema en machos (Basto, 2009).

La época de reproducción varía de acuerdo a la especie, geografía y factores ambientales a los que estén expuestos los organismos, aunque generalmente ocurren dos o tres veces por año (Leighton, 1992; Vega-Velázquez et al., 1994). En especies como *H. rufescens* la reproducción puede ocurrir a lo largo del año (Mottet, 1978), mientras que en las especies *H. fulgens* y *H. corrugata* ocurre desde el verano hasta el inicio del otoño, en la región del Sur de California (Tutschulte y Connell, 1981); sin embargo, en la parte sur de la península de Baja California, la reproducción ocurre desde el otoño hasta el principio de la primavera (Vega-Velázquez et al., 1994).

Una vez que los organismos se han fijado al fondo, su alimentación depende de la disponibilidad y abundancia de algas. Su principal fuente de alimento son las diatomeas bentónicas, aunque durante su desarrollo el alimento cambia progresivamente a macroalgas vivas (Leighton, 2000).

Las especies de abulón distribuidas en aguas mexicanas quedan comprendidas en el grupo de Haliótidos de Norteamérica, conformado por ocho especies, de las cuales siete se distribuyen en la costa oeste de la Península de Baja California: *H. fulgens* (abulón azul), *H. corrugata* (amarillo), *H. cracherodii* (negro), *H. rufescens* (rojo), *H. sorenseni* (chino), *H. kamtschatkana assimilis* (rayado) y *H. walallensis* (aplanado) (Sierra-Rodríguez et al., 2006).

La pesquería de abulón es una de las actividades pesqueras más importantes y más antiguas de la península de Baja California (~100 años), y es considerada como una actividad de bajo impacto a nivel mundial. Además, las poblaciones de abulón son escasas y la sobredemanda de este recurso en Asia genera grandes ganancias a nuestro país (Cacéres, 2002), siendo *H. fulgens* y *H. corrugata* las especies que representan el 100% de la captura total (Sierra-Rodríguez et al., 2006).

2.2 Principales patógenos de los abulones

Desafortunadamente, la actividad pesquera de abulón ha sufrido etapas críticas, que han puesto en peligro su existencia, provocando la implementación de medidas apremiantes para recuperar las poblaciones silvestres y de esta forma, mantener la actividad pesquera en niveles rentables. Dentro de los factores que han puesto en peligro la explotación de abulón como actividad pesquera, se encuentran los eventos de mortalidad masiva asociados a anomalías en las condiciones oceanográficas, que causan condiciones de hipoxia e incrementos en la acidez del agua de mar. Estos eventos también se han asociado a la ocurrencia de eventos de marea rojas, a la presencia de poliquetos o a diversos agentes patógenos como *Perkinsus olseni* (Burreson, 2006) y bacterias del género *Vibrio* spp., que causan enfermedades como la “pústula”. Otro patógeno importante es el denominado procarionte similar a Rickettsiales o RLP (del inglés Rickettsiales-like prokaryote)

Xenohalotis californiensis, considerado como el agente causal del Síndrome de Deshidratación del Abulón (SDA, por sus siglas en español), de marchitamiento o desgaste en abulón, se ha detectado tanto en abulones silvestres como cultivados (Friedman, 2006). En diversos estudios se ha reportado que *X. californiensis* como la causa de mortalidades masivas en cultivos y en bancos de abulón a lo largo de la península de Baja California (Cáceres et al., 2011).

2.2.1 Síndrome de deshidratación en abulón (SDA)

Se ha observado que el SDA presenta una patología muy compleja, y que además está asociado a eventos climáticos ENSO (por sus siglas en inglés, 'El Niño–Southern Oscillation') (Raimondi et al., 2002). *X. californiensis*, es una bacteria intracelular de la familia Rickettsiaceae, dimórfica, de forma bacilar (aprox. 332 x 1.550 nm) o esférica (1405 nm), que se reproduce dentro de vacuolas intracitoplasmáticas de 14-56 µm de diámetro ubicadas en el epitelio gastrointerstinal (Gardner et al., 1995). Sin embargo, la bacteria puede sobrevivir fuera del hospedero indeterminadamente, y su transmisión puede ocurrir a través de agua contaminada (Braid, 2004).

La caracterización clínica del SDA depende de la identificación de diversos signos, entre los que se incluyen la presencia del agente causal y cambios morfológicos en los tejidos

(como atrofia del músculo del pie, disminución de glucógeno en el pie y disminución de haces musculares). En abulones infectados por *X. californiensis* se han reportado también cambios metaplásicos de la glándula digestiva que involucran transformación de los fondos terminales secretores en epitelios de absorción/transporte (Friedman, 2006). Es importante recalcar que estos cambios no son indicadores exclusivos de la enfermedad.

Durante la infección (Fig 2.), esta bacteria patógena ingresa al abulón a través de la boca, pasando por el esófago hasta llegar al tracto digestivo en donde se adhiere a las paredes y penetra hacia el interior de las células epiteliales columnares (Cacéres, 2002).

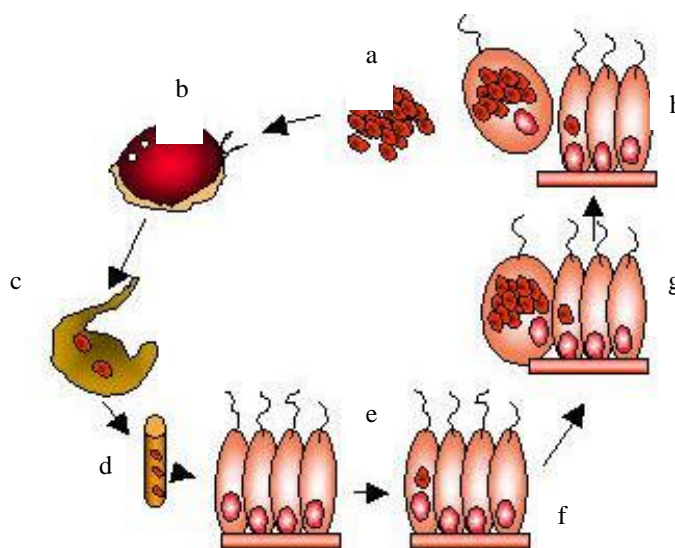


Figura 2. Proceso de infección de *X. californiensis* en *Haliotis* spp a) Bacterias en la columna de agua, b) Las bacterias entran al abulón, y pasan por el esófago alcanzando tracto digestivo (c). Posteriormente, las bacterias se adhieren a las paredes de los órganos del sistema digestivo (d), y penetran al interior de las células epiteliales columnares (e), donde comienzan a multiplicarse dentro del citoplasma de las células atrofiándose (f). La célula infectada alberga una colonia de bacterias en crecimiento (g), hasta que se lisa expulsando las bacterias infectivas (h) y reiniciando el ciclo de infección. (Tomado de Cáceres, 2002).

Durante la enfermedad, se ha observado que los abulones silvestres cuelgan con frecuencia de substratos horizontales (en vez de verticales o invertidos) y parecen débiles y atrofiados, mientras que en abulones cultivados se observan cuadros de anorexia (Haaker et al., 1992). Es importante señalar que este síndrome sólo se ha asociado a abulones, y que la presencia

de *X. californiensis* se ha observado exclusivamente en especies de abulón (Friedman, 2006).

2.2.2 *Ganglioneuritis viral en abulón (AVG)*

La mayoría de las enfermedades que se han reportado en *Haliotis* spp., son causadas principalmente por bacterias y otros parásitos (Bower, 2000), y son pocos los reportes acerca de infecciones causadas por virus. Sin embargo, cuando ocurre este tipo de enfermedades las afectaciones se observan principalmente en los sistemas nervioso y digestivo, además de los riñones (Wang et al., 2004). Hooper et al. (2007) reportaron mortalidades de *H. laevigata* y *H. rubra* durante el 2005 en las costas de Australia. Los organismos infectados presentaban lesiones necrosadas con inflamación en la región de la boca con prolapso, la rádula y los cartílagos que dan soporte a la región bucal sobresalían de la boca, mientras que en la región del pie se observó pérdida de adhesión al substrato y eventualmente la muerte. En análisis histológicos, las mayores lesiones se registraron en tejido nervioso, principalmente en los ganglios cerebrales, pleuropedales y bucales, y en estructuras como el pie y en las vísceras (aunque estos últimos no fueron consistentes), sin embargo, microscópicamente no se observaron bacterias en las áreas con lesiones.

Tan et al. (2008) identificaron mediante microscopía electrónica a herpes virus de abulón (AbHV) como el agente causal de los signos clínicos reportados por Hooper et al. (2007) en *H. laevigata* y *H. rubra*. Aparentemente, esta enfermedad está restringida o parece no afectar a otros moluscos o animales acuáticos (Corbeil et al., 2012).

2.2.3 *Perkinsosis en abulón*

En el capítulo 2.2.7 del manual de pruebas de diagnóstico para animales acuáticos de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, Office International des Epizooties), se describe la infección de distintas especies de abulón (*H. rubra*, *H. laevigata*, *H. scalaris* y *H. cyclobates*) por *Perkinsus olseni*. Los eventos de mortalidad provocados por este patógeno han causado pérdidas económicas muy importantes. Se ha observado que el

patrón de la enfermedad se presenta un año posterior a la infección, siendo los signos generales: infección en tejidos conjuntivos, glándula digestiva de color pálido y nódulos en las branquias. Aunque se presentan signos observables por métodos histológicos, no hay signos específicos descriptivos para la infección de *P. olseni*, siendo únicamente el análisis histológico y la detección del patógeno por PCR los métodos de diagnóstico confirmativos (Burreson, 2006).

2.1.4 Enfermedades causadas por el género *Vibrio*

Dentro de la biota intestinal presente en Haliotidos, las bacterias del género *Vibrio* son las más dominantes, y se ha sugerido que tienen una participación muy importante para su hospedero al producir enzimas digestivas que ayudan al organismo a digerir su alimento (Tanaka et al., 2004; Zhao et al., 2012).

Tanaka et al. (2004) reportaron la presencia de *Vibrio tapetis* y *V. halioticoli* en organismos adultos de *H. discus hannai*, como parte de la biota intestinal, además identificaron bacterias de los géneros *Mycoplasma*, *Sphingomonas*, *Arcobacter*, *Staphylococcus* y *Ruegeria*, entre otros. Huang et al. (2010) reportaron la presencia de *V. shilonii*, *V. sp.* MY-2008-U42NL y *V. harveyi* en organismos adultos de *H. diversicolor*, como especies que forman parte de la flora bacteriana (sin causarle daño alguno a su hospedero). Zhao et al. (2012) reportaron la presencia de *V. shilonii*, *V. harveyi*, *V. harveyi* LA08005 y *V. harveyi* XC08001, como parte de la biota intestinal de especímenes adultos de *H. diversicolor*. Sin embargo, también se han descrito especies como *V. alginolyticus*, *V. carchariae* y *V. fluvialis* como agentes causales de vibriosis en abulón (Li et al., 1998; Liu et al., 2000; Nicolas et al., 2002).

Elston y Lockwood (1983) reportaron la presencia de *V. alginolyticus* en juveniles de *H. rufescens* cultivados en California. De acuerdo a algunos reportes se ha observado que esta infección bacteriana puede causar la ruptura y crecimiento sistémico de bacterias en los senos vasculares y neuronales, así como degeneración periférica de neuronas e infiltración en las células hospedero, lo que retrasa la respuesta ante la infección. Li et al. (1998) reportaron la presencia de *V. fluvialis* en *H. discus hannai* en las costas de China, la cual

generó pústulas en los organismos y posteriormente la muerte, por lo que fue nombrada enfermedad de la pústula.

De 1997 a 1999 se reportaron mortalidades severas (>80%) en *H. tuberculata* (en el norte de Gran Bretaña desde Saint Malo a Erquy), encontrándose como agente causal *V. carchariae*, patógeno que provocó la aparición de pústulas blanquecinas en el pie y la muerte posterior de los organismos (Nicolas et al., 2002). Actualmente no se ha reportado la presencia de ninguna especie de *Vibrio* para *H. fulgens* y/o *H. corrugata*.

2.2 Las proteasas y el sistema inmune

En el interior de las células, la degradación y subsecuente reciclaje de componentes celulares ocurre en los lisosomas, por lo que reciben carga hetero-autofágica, que termina degradándose en el lumen de los mismos. Para que esta degradación se lleve a cabo, los lisosomas contienen un gran número de hidrolasas ácidas (fosfatasas, nucleasas, glicosidas, proteasas, peptidasas, sulfatasas, lipasas, entre otras) por lo que son llamados “bolsas suicidas”, ya que son las unidades de depósito de la “basura” capaces de digerir la mayor cantidad de macromoléculas celulares (Kirkegaard y Jäätelä, 2009) (Fig. 3).

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces amino, por lo que son mediadoras de muchos procesos como la coagulación, digestión y maduración de citosinas y prohormonas, así como apoptosis y degradación de proteínas intracelulares. En la célula, la proteólisis es un mecanismo dependiente de ubiquitina, que regula la función y destino de las proteínas (Chapman et al., 1997). Entre las proteasas intracelulares de los lisosomas se encuentran hidrolasas, de las que las más estudiadas son las catepsin-proteasas.

2.2.1 *Catepsinas y sus inhibidores*

Este grupo de enzimas se clasifican de acuerdo a la naturaleza del residuo catalítico como aspárticas (D y E), serínicas (A y G) y cisteínicas (B, C, H, F, K, L, O, S, V, W y XZ), (Kirkegaard y Jäätelä, 2009), la totalidad de las cuales han sido implicadas en la generación

de antígenos peptídicos presentes en células T (en vertebrados), en la ruta endocítica por unión a la membrana de inmunoglobulinas en las células B, y en la pinocitosis primaria en células dendríticas o macrófagos (Chapman et al., 1997).

Las catepsinas aspárticas, contienen un sitio catalítico formado por dos residuos de aspartato (Asp) y con capacidad para 8 residuos de aminoácidos en la unión al sitio activo, sin embargo, hay preferencia por residuos hidrófobicos alrededor del enlace (Benes et al., 2009). Dentro de las principales funciones se encuentran la selección de los complejos péptido-MCH II, aunque catepsina D también participa en la activación del iniciador caspasa-8 en el proceso de apoptosis (Conus y Simon, 2010).

Las catepsinas serínicas, contienen tres residuos de aminoácidos histidina (His), aspartato (Asp) y serina (Ser), esenciales en el proceso catalítico, tienen la principal función de activar los neutrófilos y participan en procesos inflamatorios (Kudo et al., 2009)

Las catepsinas cisteínicas, o catepsinas tipo cisteín proteasas, presentan una alta actividad hidrolítica a pH 4-6.5, con una alta tendencia del grupo tiol a oxidarse. Se pueden encontrar en todos los organismos vivos y su actividad está relacionada con la presencia de residuos de cisteína (Cys o C) e histidina (His o H) en el sitio activo, los cuales a pH 3.5-8 existen como par iónico (Cys)-S⁻/(His)-Im⁺H, formando un intermediario s-acyl-enzima vía ataque nucleófilico al grupo tiol del residuo de cisteína en el grupo carbonil durante la hidrólisis de enlaces peptídicos.

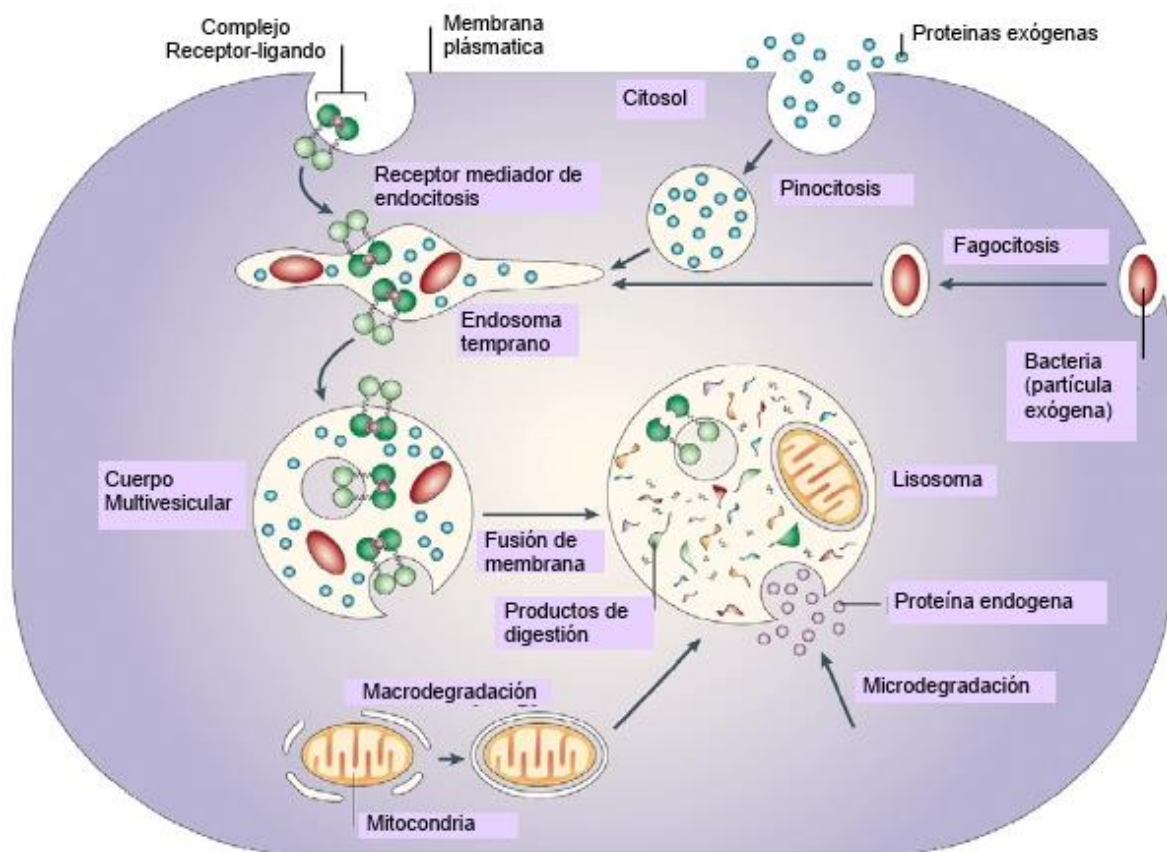


Figura 3. Procesos de degradación en la célula mediados por el lisosoma (Tomado de Ciechanover, 2005).

Posteriormente, se libera el fragmento C-terminal del producto cortado, una molécula de agua reacciona con el intermediario y se libera el fragmento N-terminal; una vez ocurrido esto, la molécula libre es regenerada para iniciar un nuevo ciclo catalítico (Fig. 4) (Grzonka et al., 2001).

Dentro de las catepsinas cisteínicas, se sabe que las catepsinas B, H y L son las que se sintetizan en mayor cantidad (Brix et al., 2008), sin embargo, su producción (como la de otras proteasas) está regulada para evitar la autólisis. La expresión de estas catepsinas está regulada por la transcripción del gen apropiado, y el rango de síntesis y degradación de proteasas, así como de su inhibidor específico (Grzonka et al., 2001).

Dentro de los principales inhibidores proteicos de catepsinas, se pueden mencionar las cistatinas (Turk et al., 1997), tiropinas (Lenarcic y Bevec, 1998) y serpinas (Liu et al., 2003), entre otros; estos inhibidores son competitivos, reversibles y de unión fuerte, y previenen la unión del sustrato al sitio activo de la enzima.

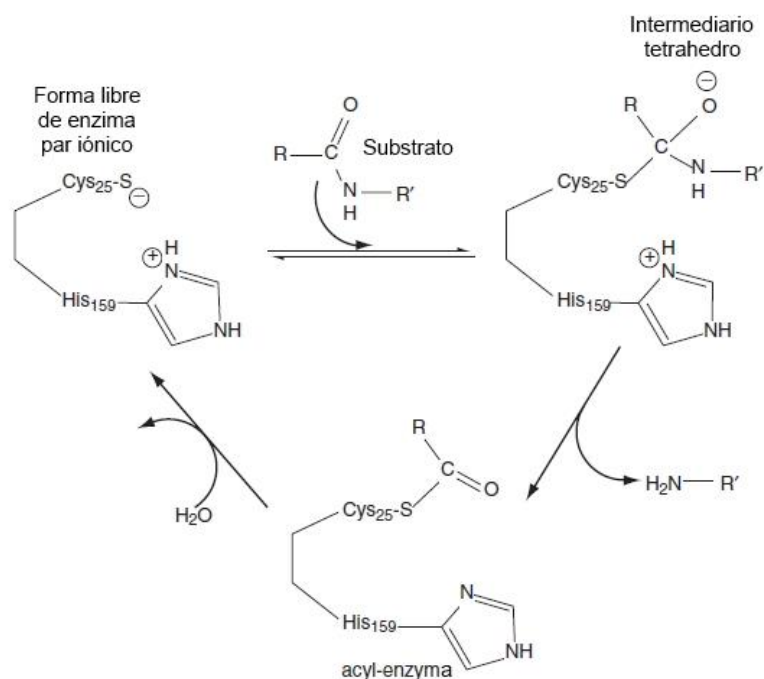


Figura 4. Mecanismos de hidrólisis de catepsinas cisteínicas (Tomado de Brömer, 2000).

De acuerdo a su función, los inhibidores se clasifican en de emergencia o regulatorios. Las cistatinas son los típicos inhibidores de emergencia, ya que son las primeras en actuar ante un escape de proteasas o la presencia de proteasas de patógenos invasores; todos los inhibidores de proteasas ayudan al balance fisiológico normal del organismo (Turk et al., 2012).

Las cistatinas se encuentran presentes en el citosol y el núcleo de muchas células, pueden actuar intra- o extra-celularmente y forman complejos enzima-inhibidor (Fig. 5), manteniendo así un equilibrio y evitando actividad perjudicial para la célula.

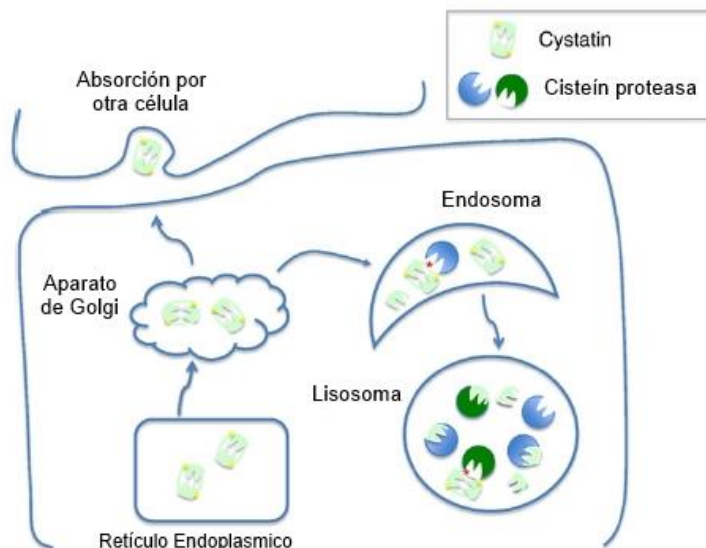


Figura 5. Formación del complejo enzima-inhibidor de catepsina y cistatina (Tomado de Watts, 2012).

De acuerdo a Otto y Schirmeister (1997), los inhibidores de catepsinas, se dividen en cistatinas tipo 1 (estefinas), cistatinas tipo 2 y cininógenos.

Las cistatinas de tipo 1 actúan intracelularmente y se han descrito como protectores de órganos linfáticos con sobreactividad de proteasas cisteínicas, en células epiteliales y leucocitos. Generalmente, están compuestos por aproximadamente 100 residuos de aminoácidos, y tienen un peso molecular aproximado de 11 kDa (Grzonka et al., 2001). Estos se dividen en cistatina A (estefina A) y cistatina B (estefina B). La cistatina B se distribuye uniformemente en diferentes tejidos y se une fuertemente a las catepsinas B, H y L (Turk et al., 1997). Este tipo de inhibidores juega un papel importante en la protección contra las proteínas que se “fugan” de los lisosomas y son parte fundamental del sistema biológico de defensa contra organismos invasores (Li et al., 2010b).

Los inhibidores *cistatina* tipo 2, tienen un peso molecular de 13-24 kDa (Oliveira et al., 2003), presentan 120-122 residuos aminoacídicos y son sintetizadas con un péptido señal de 19-28 residuos, lo que sugiere funciones o actividades extracelulares. Además, contienen

dos puentes disulfuro, y la mayoría son glicosilados (Grzonka et al., 2001). Esta familia de cistatinas se ha asociado principalmente a patologías neurodegenerativas en mamíferos (Magister y Kos, 2013)

Los *cininógenos* han sido identificados solamente en ratón, y se han descrito como inhibidores de tipo glicoproteína sintetizadas conteniendo un péptido señal de 18 residuos aminoácidos; se dividen en dos grupos: los de alto peso molecular (aprox. 120 kDa) y los de bajo peso molecular (50-80 kDa) (Otto y Schirmeinster, 1997). Estos inhibidores se suelen encontrar en el plasma sanguíneo y en el líquido sinovial (Grzonka et al., 2001), también son precursores de los péptidos vasodilatadores bradiquina y calidina (Otto y Schirmeinster, 1997).

2.3 Sistema inmune en invertebrados: el papel de catepsina B y cistatina B.

El conocimiento sobre el sistema inmune de invertebrados se ha incrementado significativamente en la última década, encontrándose una gran cantidad de señales-respuesta ante diversos agentes invasores. Recientemente, se reportó que en células de gasterópodos, la diversidad de transcritos que corresponden a proteínas con efecto inmune es baja, mientras que la diversidad de transcritos involucrados en rutas de señalización o mecanismos regulatorios en procesos oxidativos y antioxidativos es alta (Fig. 6). La transcripción de genes potencialmente implicados en las redes de regulación o vías de señalización incluyen numerosas proteasas de tipo serin y cisteín, así como inhibidores de proteasas que posiblemente actúan en las cascadas enzimáticas de activación de vías de reconocimiento de agentes invasores mediadas por receptores Toll, proteínas de unión a calcio implicadas en la señalización de calcio, factores de transcripción o quinasas tales como las MAP (proteínas activadas por mitógenos), que son elementos clave de las vías MAPK (proteín-quinasa activadas por mitógenos) en la respuesta inmune (Deleury et al., 2012).

Lefebvre et al. (2004) han sugerido que la presencia de cistatina B en la sanguijuela *Theromyzon tessulatum* forma parte de su sistema inmune innato, y que podría tener una función inhibitoria de cisteín proteasas.

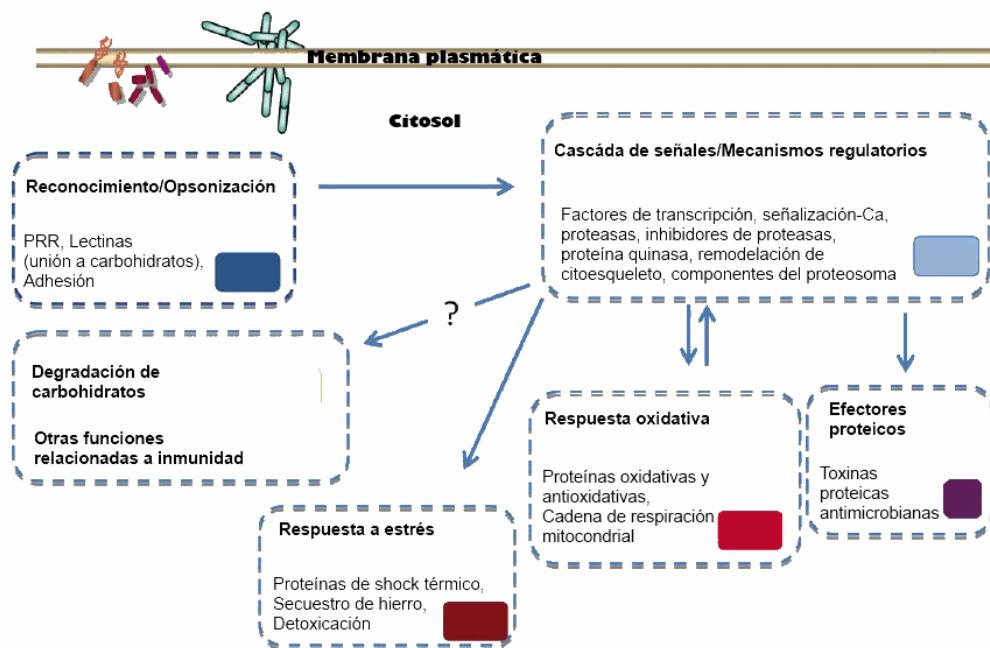


Figura 6. Esquema que representa la relación entre los principales procesos inmunes o proteínas del sistema inmune en invertebrados (Tomado de Deleury et al., 2012).

Estos autores infectaron ejemplares de *T. tessulatum* con *Escherichia coli* y *Micrococcus luteus* y, utilizando técnicas de fluorescencia, detectaron cistatina B en organismos infectados a partir de las 3 horas, observando un incremento progresivo de la actividad hasta las 24 horas. Sin embargo, la relación específica de inhibición de cisteína proteasa por cistatina B como parte de la respuesta del sistema inmune no se determinó y se ha recalado la necesidad de realizar estudios al respecto.

Li et al. (2010b) observaron que al infectar al cangrejo chino de mitones (*Eriocheir sinensis*) con la bacteria gram negativa *Listonella anguillarum* y con la levadura *Pichia pastoris* GS115 la expresión del gen de la cistatina B (Escyst) en gónada, hemolinfa, hepatopáncreas, branquia y músculo se incrementó significativamente, tejidos involucrados en la respuesta inmune innata de invertebrados. El incremento en la expresión de este gen en hemocitos a las 3 h posteriores a la infección (hpi) con levadura y a las 12 hpi con la bacteria, sugiere una función de protección ante invasiones por microbios.

Al igual que otros invertebrados marinos, en moluscos se ha observado la presencia de un sistema de defensa que los protege ante la invasión de patógenos, y que presenta características de un sistema inmune innato o natural (Vargas-Albores y Barracco, 2001). Este sistema natural, consiste en dos tipos de inmunidad, celular y humoral, está última constituida por enzimas lisosomales, aglutininas, lecitinas y péptidos antimicrobianos (Tiscar y Mosca, 2004). En los moluscos bivalvos, las enzimas lisosomales se han detectado principalmente en hemocitos granulares, y son liberadas hacia las vacuolas digestivas para la degradación de los microorganismos fagocitados; sin embargo, también pueden ser liberadas al plasma bajo el estímulo de la presencia de microorganismos patógenos o en las reacciones de encapsulamiento. De éste modo, el nivel de la actividad enzimática en plasma sirve como indicador del sistema de defensa, reflejando un proceso inflamatorio en curso (Vargas-Albores y Barracco, 2001) (Fig. 7).

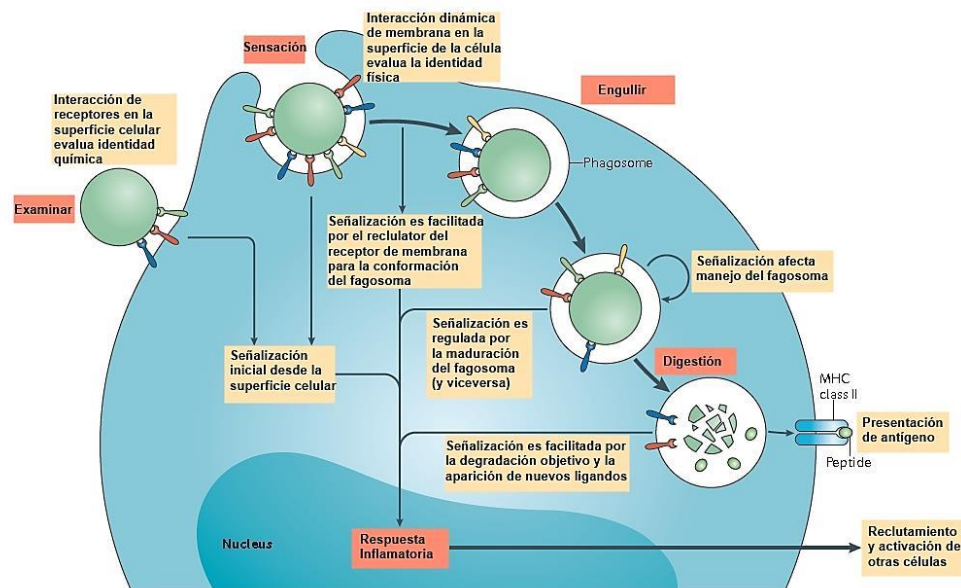


Figura 7. Etapas de la fagocitosis que termina en una respuesta inflamatoria (Tomado de Underhill y Goodridge, 2012).

En huevos del mejillón *Mytilus edulis* se detectó baja actividad de catepsina B, mientras que en manto y células adipoglandulares la actividad fue alta, lo que podría indicar que la enzima no está involucrada en la gametogénesis, sino en procesos fagocíticos (Peek y

Gabbot, 1990). De igual manera, se reportó que en la almeja manila *Ruditapes philipinarum* infectada experimentalmente con *V. tapetis* (bacteria gram negativa), la actividad de cistatina B presentó mayor actividad en hemocitos (a las 3 y 48 hpi) que en otros tejidos estudiados, lo que sugiere que podría participar en la respuesta inmune de esta almeja, posiblemente como inhibidor de cistein proteasas; sin embargo, no existen reportes que aborden esta relación (Premachandra et al., 2013).

2.3.1 Sistema inmune en organismos del género *Haliotis*

Los abulones, al tener un sistema circulatorio abierto son susceptibles a patógenos y contaminantes presentes en el agua; sin embargo, poco se conoce sobre su respuesta inmune. Lebel et al. (1996) distinguieron diversas formas de hemocitos en *H. tuberculata*, representados principalmente por células de tipo fibroblasto y el resto por células epiteliales similares. Posteriormente, se han descrito los efectos de contaminantes en su migración y actividad fagocítica, ligando directamente su actividad como respuesta al estrés y reacción inmune usando parámetros como el número de hemocitos circulantes (Shelang et al., 2003). En 2004, Shuhong et al. reportaron que la respuesta del abulón australiano *H. diversicolor supertexta* ante bacterias patógenas (*V. parahaemolyticus*) y no patógenas (*E. coli*) es diferente, sin embargo, el mecanismo de acción resultó incierto. En hemocitos de *H. tuberculata* se reportó la presencia de proteínas de shock térmico HSP₇₀ y HSP₉₀ bajo estrés térmico, encontrando que la activación transcripcional no se relaciona a la síntesis y presencia de estas proteínas como respuesta parte del sistema inmune, sino como un mecanismo de señalización (Farcy et al., 2007). Jia et al. (2009) reportaron la expresión de diferentes catepsinas como mecanismo de defensa celular en *H. diversicolor supertexta* en presencia de tributilina (TBT), un compuesto altamente tóxico que provoca la disrupción de la membrana lisosomal. Premachandra et al. (2012) reportaron que la hemolinfa, branquias y manto son los tejidos involucrados en las funciones del sistema inmune innato en abulones, ya que al infectar *H. discus discus* con *V. parahaemolyticus* se observó un incremento en la expresión de cistatina B en diferentes tejidos (branquia, manto, músculo, hemocitos, hepatopáncreas, tracto digestivo y tejido testicular) hasta 24 hpi en branquias.

Sin embargo, la expresión en hemocitos fue mayor durante las primeras 6 hpi, sugiriendo así que en presencia de este inhibidor, la cistatina B tiene una participación en el sistema inmune, aunque aún no se ha determinado cuál es su participación exacta ni el tipo de relación que presenta con las catepsinas tipo cistein-proteasas, también involucradas.

Qiu et al. (2013) reportaron la presencia de catepsina B en diferentes tejidos de *H. discus hannai* (hemocitos, musculo del pie, branquias, manto, musculo abductor y glándula digestiva), la cual se regula positivamente mediante estimulación con bacterias patógenas (*Vibrio anguillarum*), observando una respuesta franca de los hemocitos a partir de las 3 y hasta las 48 hpi. En glándula digestiva, se detectó catepsina B a partir de las 6 y hasta las 24 hpi, lo que sugiere un rol importante de esta proteasa tanto durante la respuesta inmune como bajo condiciones fisiológicas normales.

Actualmente, en las bases de datos como NCBI y EML (entre otras), existen pocas secuencias reportadas de catepsinas y cistatinas en abulón, sin embargo, existen algunas secuencias principalmente derivadas de etiquetas de secuencia expresadas (ESTs) (Tabla II), por lo que se puede observar claramente que el conocimiento de la información a nivel molecular de proteasas y de inhibidores en este tipo de organismos es escasa, y considerando su importancia comercial y los problemas de patógenos que se presentan en ellos, su conocimiento es de suma importancia para entender sus mecanismos fisiológicos y de defensa.

Tabla II. Número y tipo de secuencias reportadas en la base de datos del NCBI para algunas especies de *Haliotis* (Octubre 2013).

Especie	Tax ID	Nucl	Prot	Gen	ESTs	Proteasas	Inhibidores
<i>H. corrugata</i>	6453	459	248	0	0	0	0
<i>H. rufescens</i>	6454	325	174	0	354	2(S/I)	0
<i>H. cracherodii</i>	6455	86	75	0	0	0	0
<i>H. fulgens</i>	6456	138	119	0	0	0	0
<i>H. discus hanai</i>	42344	1697	86	0	5787	1	2
<i>H. discus discus</i>	91233	253	171	0	839	1	2
<i>H. diversicolor</i>	283615	97	90	0	306	2	1
<i>supertexta</i>							
<i>H. asinina</i>	109174	828	141	0	8666	0	0

Notación: Nucl, nucleótidos; Prot, proteínas; Gen, genomas; ESTs, etiquetas de secuencias expresadas; S/I, sin identificar.

3. JUSTIFICACIÓN

Dado que se han detectado catepsinas tipo cistein proteasa como parte del sistema inmune de moluscos, así como proteínas con actividad inhibitoria de cisteín proteasas, el estudio de la expresión de los genes de estas proteínas permitirá generar herramientas básicas para elucidar algunas de las vías de señalización del sistema inmune ante la infección de patógenos en moluscos, así como ampliar el conocimiento del sistema inmune innato de los abulones.

4. HIPÓTESIS

Si los inhibidores de proteasas regulan la actividad de proteasas en ausencia de microorganismos invasores, y la catepsina B juega un papel importante dentro del sistema inmune innato de los invertebrados, entonces la abundancia de transcritos del gen de la catepsina B en organismos saludables de abulón azul *H. fulgens* y abulón amarillo *H. corrugata*, será menor que la del gen que codifica a su inhibidor, cistatina B.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar los niveles basales de expresión a nivel trascricional de la catepsina B y la cistatina B en *H. fulgens* y *H. corrugata*.

5.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

5.1.1 Validar los genes que codifican para la proteína ribosomal L5, succinato deshidrogenasa (SHD) y factor de elongación 1 α como genes constitutivos para estudios en *H. fulgens* y *H. corrugata*.

5.1.2 Evaluar la expresión de transcritos que codifican la catepsina B y cistatina B en *H. fulgens* y *H. corrugata*.

5.1.3 Evaluar los niveles de expresión de los transcritos de los genes que codifican las proteínas de shock térmico 70 (HSP₇₀) y 90 (HSP₉₀) involucrados en respuesta inmune – respuesta a estrés.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Obtención de muestras

Se colectaron 10 organismos adultos de *H. fulgens* y 11 de *H. corrugata* de la región de Bahía Tortugas, Baja California Sur (114°53'45" W y 27°41'30" N). A cada organismo, se le extrajo aproximadamente 1 mL de hemolinfa sin anticoagulante, que se congeló a -20° C. Las muestras se etiquetaron de manera individual, y se registraron los siguientes datos: sitio de colecta, fecha, peso, talla, especie y estado de salud aparente (saludables o enfermos). Las muestras se trasladaron al Laboratorio de Genética Molecular del CIBNOR, S. C., y se preservaron a -80°C hasta su uso posterior.

6.2 Extracción de ARN

La extracción de ARN se llevó a cabo mediante la técnica descrita por Chomczynski y Sacchi (2006). Brevemente: se utilizaron 100 µL de cada muestra de hemolinfa y se añadieron 700 µL de solución D (4 M tiocianato de guanidina, 25 mM citrato de sodio, pH 7.0, 0.5% N-lauroylsarcosine (p/v) y 0.1 M β-2-mercaptoetanol), 70 µL de 2 M acetato de sodio y se mezcló por inversión. Posteriormente se agregaron 700 µL de fenol saturado y una mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (49:1), mezclando vigorosamente por 10 s, para posteriormente incubar las muestras en hielo por 15 min. A continuación, la mezcla se centrifugó por 20 min a 10,000 *xg* a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se añadieron 700 µL de isopropanol absoluto para precipitar el ARN. Las muestras se incubaron por 90 min a -20°C y posteriormente se centrifugaron por 20 min a 10,000 *xg* a 4°C. El sobrenadante se decantó y el pellet se disolvió en 300 µL de solución D y se realizó una segunda precipitación con 300 µL de isopropanol absoluto. Posteriormente, las muestras de ARN total se incubaron por 40 min a -20°C y se centrifugaron por 10 min a 10,000 *xg* a 4°C. El sobrenadante se descartó y el pellet de ARN se lavó con 700 µL de

etanol al 75%. Las muestras se centrifugaron por 5 min a 10,000 xg a 4°C, el sobrenadante se descartó y el precipitado de ARN se secó a temperatura ambiente por 10 min. Finalmente, el precipitado libre de etanol se disolvió en 100 μL de H₂O DEPC (0.02% Dietilpirocarbonato en H₂O, estéril). Para evaluar la calidad y pureza de las preparaciones de ARN, las muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa 2%-EtBr y Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc), documentando digitalmente los geles bajo luz ultravioleta (UVI, UVP Inc.) y obteniendo las lecturas de las muestras a 260 y 280 nm; considerando como de buena calidad aquellas con una relación A260/A280 entre 1.8 y 2.0.

6.3 Síntesis de ADN complementario (ADNc)

La transcripción reversa del ARN se realizó utilizando el kit “ImProm-II Reverse Transcription System” (Promega Corp. USA,) (Tabla III)

Tabla III. Lista de reactivos utilizados para realizar transcripción reversa

REACTIVO	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN USADO
Primer Oligo dT	0.5 μg	1 μL
ARN extraído	400 ng	5 μL
Agua libre de nucleasas		5.49 μL
Inhibidor de ribonucleasa RNAsin	0.5 U	0.5 μL
Transcriptasa reversa	1 U	1 μL
Buffer de reacción ImProm II	5X	4 μL
Cloruro de magnesio	50 mM	3 μL
Mezcla de dNTP's	10 mM	1 μL

Una vez preparadas con un volumen final de 20 μL , las reacciones se incubaron a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, se sintetizó el ADNc incubando las

muestras a 42° C por 60 min; a continuación las muestras se transfirieron a 70° C por 5 min para detener la reacción de síntesis.

6.4 Reacción en cadena de la polimerasa punto final (PCR)

Con la finalidad de determinar la identidad de los amplicones a analizar por qPCR, se tomaron por duplicado 6 µL ADNc de una muestra de *H. fulgens* y una muestra de *H. corrugata*, y se ajustó la mezcla de reacción a 75 µL utilizando illustra™ PureTaq Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare) y 6 µL de mezcla de primers específicos (forward y reverse) a 100 pMoles/µL (Tabla IV) para amplificar los genes catepsina B (*catB*), cistatina B (*cistB*), succinato deshidrogenasa (*sdh*), proteína ribosomal L5 (*rpl5*), factor de elongación 1α (*fe1α*), HSP₇₀ (*hsp70*) y HSP₉₀ (*hsp90*). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador TC-312 (@TECHNE) con el siguiente protocolo de amplificación: 94°C, 1 min (1 ciclo), 94°C por 30 s, 60°C por 30s, 72°C por 30s (35 ciclos) y un ciclo a 72°C por 5 min. Una vez obtenidos los amplicones de cada gen, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa 2%-TAE 1%, para cortar las bandas correspondientes a cada gen, las cuales se purificaron individualmente utilizando el kit illustra™ GFX 96 PCR Purification (GE Healthcare) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras purificadas (una muestra para cada gen y especie) se enviaron al servicio de secuenciación de la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM. La identidad de las secuencias obtenidas, se obtuvo mediante el programa BlastN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), y se editaron con el programa Chromas Pro (Technelysium).

Tabla IV. Lista de oligos utilizados para PCR y qPCR.

Nombre	Clave	SECUENCIA 5' - 3'	Referencia
Proteína ribosomal L5 (<i>rpl5</i>)	RPL5_F RPL5_R	TCACCAACAAGGACATCATTTGTC CAGGAGGAGTCCAGTGCAGTATG	Wan et al., 2011.
Succinato deshidrogenasa (<i>sdh</i>)	SDHA_F SDHA_R	CTAGCTCTGCCTGTCACATACCA TACCAAACACAAACCCTGTGGATA	

Factor de elongación 1 α (<i>fe1α</i>)	ELF_F ELF_R	CTGCCACACAGCCCATATTG CCACACACATGGGCTTGCT	
HSP ₇₀ (<i>hsp70</i>)	abHSP70_F abHSP70_R	CGGTGAGCGCAATGTTC CCAAGTGGGTGTCTCCA	Farcy et al., 2007.
HSP ₉₀ (<i>hsp90</i>)	abHSP90_F abHSP90_R	CCAGGAAGAATATGCCGAGT CACGGAACTCCAAGTACC	
Catepsina B (<i>catB</i>)	abCatB_F abCatB_R catB025F catB122R	TGGCGGCACCTGAATACTA GCCCAACAGACGCTTGAA CACAGATGCCATGATTGACA GACGCTTGAAGTAGGACTGG	Qiu et al., 2013. Este trabajo
Cistatina B (<i>cistB</i>)	Ab-cytb F1 Ab-cytb R2	GTGGTGGTGC AACCGAAGTGAAAT TGCTACCACTTGTGAACGGAAGA	Premachandra et al., 2012.

6.5 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo-real cuantitativa (qPCR)

Se prepararon dos grupos de muestras (pools) de ADNc sintetizado por especie (una de organismos saludables y otra de organismos enfermos) teniendo en total cuatro pools de muestras. Se prepararon 11.5 μL de mezcla de reacción para PCR conteniendo lo siguiente: 5 μL de SsoFast™ EvaGreen® SuperMix (®BioRad), 6.1 μL de H₂O miliQ y 1.4 μL de mezcla de primers específicos (10 pmol) (forward y reverse) para qPCR (Tabla III), y se agregó 1 μL de cada pool (Hfe, Hfs, Hce y Hcs). El programa de amplificación que se utilizó fue el siguiente: un ciclo a 94°C 1 min, 30 ciclos de 94°C 20 s, 60°C 20 s, 72°C 20 s y un ciclo de 72°C por 3 min (Light Cycler II 480 ®ROCHE). Se realizó una curva de disociación para validar la especificidad de cada oligonucleótido incrementando la temperatura de 55°C hasta los 95°C a una tasa de 0.2°C cada 15s; las reacciones se realizaron por triplicado.

La eficiencia del PCR se validó mediante la construcción de curvas estándar para cada gen, utilizando el producto de PCR purificado correspondiente (apartado 5.4), cuantificado y ajustado a una concentración de 5 $\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$ y diluido de forma serial (1:10) en agua miliQ desde una concentración de 5 $\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$ hasta 5 $\text{ng}\mu\text{L}^{-1} \times 10^{-5}$. Para construir la curva estándar de cada gen se usaron como templado 4 diluciones preparadas, graficando el valor

promedio de C_q (ciclo de amplificación en el que la fluorescencia que se emite por muestra se eleva rebasando el umbral) (Bustin, 2000) contra el log de la cantidad inicial de ADNc presente en la dilución. La eficiencia se determinó mediante la fórmula:

$$E=10^{[-1/\text{pendiente}]} \quad (1)$$

Se estimó el número de copias de cada gen y grupo de muestras (Tabla VI), usando como base la concentración del fragmento, el peso de los nucleótidos (650 nanogramos) y el tamaño del fragmento amplificado (pb), al aplicar la fórmula (<http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>):

$$\text{Número de copias} = \frac{(\text{concentración del templado}) (6.022 \times 10^{23})}{(\text{tamaño del fragmento}) (1 \times 10^9) (650)} \quad (2)$$

Una vez realizadas las curvas estándar, se cuantificó el cambio en la concentración del transcrito (ARNm) de catepsina B y cistatina B, separando organismos saludables y organismos enfermos por especie. Los datos se analizaron usando el método de cuantificación $2^{-\Delta\Delta C_q}$ (Livak y Schmittgen, 2001), de acuerdo a la fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta C_q} = ([C_{q,CD} - C_{P,REF}]_{\text{enfermos}}) - ([C_{q,CD} - C_{q,REF}]_{\text{saludables}}) \quad (3)$$

en donde:

$C_{P,CD}$ es el C_P del gen de catepsina B o cistatina B

$C_{P,REF}$, es el C_P del gen de referencia, todos los genes evaluados en organismos saludables y enfermos.

6.6 Validación de genes constitutivos

Una vez que se obtuvieron las curvas de expresión de los genes constitutivos (*rpl5*, *sdh* y *fe1 α*), se realizó un análisis estadístico para su validación utilizando los programas Bestkeeper y Normfinder.

6.7 ANOVA de 2 vías

Una vez obtenidas las curvas de expresión, se procedió a realizar un análisis ANOVA de 2 vías en el programa Statistica ver 7.1. El análisis se realizó para cada gen (*catB*, *cistB*, *hsp70*, *hsp90*), comparando organismos saludables y organismos enfermos, utilizando como gen de referencia el determinado en el apartado 5.6.

7. RESULTADOS

7.1 Muestras biológicas

Durante el mes de mayo del 2013, se tomaron 21 muestras de hemolinfa de organismos de *H. fulgens* y *H. corrugata* de la región de Bahía Tortugas, B.C.S (Fig. 8), las cuales fueron congeladas y preservadas a -80°C . Posteriormente, se trasladaron al Laboratorio de Genética Molecular del CIBNOR, S.C. (Unidad La Paz) para su procesamiento. Las muestras se clasificaron de acuerdo a la condición del organismo, saludable o enfermo (con sintomatología de SDA), obteniéndose 12 organismos saludables (6 de *H. fulgens* -Hfs- y 6 de *H. corrugata* -Hcs-) y 9 organismos enfermos (4 de *H. fulgens* -Hfe- y 5 de *H. corrugata* -Hce-) (Tabla V).

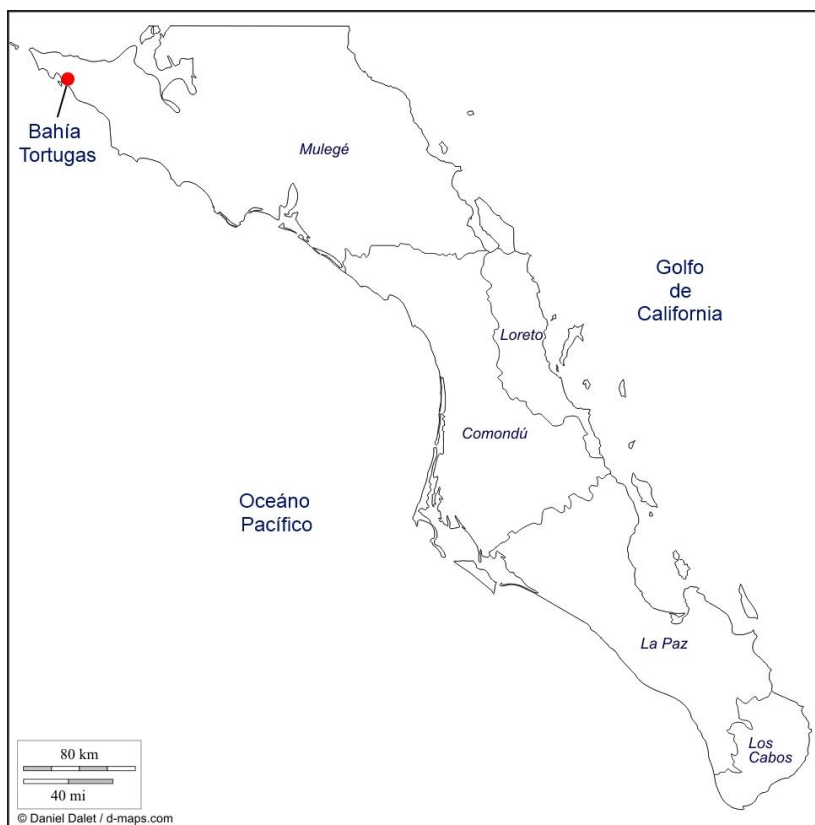


Figura 8. Mapa geográfico de la localidad muestreada.

Tabla V. Relación de muestras de *H. fulgens* y *H. corrugata*.

Clave del organismo	Especie	Condición
1S	<i>H. fulgens</i>	saludable
2S	<i>H. fulgens</i>	saludable
3S	<i>H. fulgens</i>	saludable
4S	<i>H. fulgens</i>	saludable
5S	<i>H. corrugata</i>	saludable
6S	<i>H. corrugata</i>	saludable
7S	<i>H. fulgens</i>	saludable
8S	<i>H. corrugata</i>	saludable
9S	<i>H. corrugata</i>	saludable
10S	<i>H. corrugata</i>	saludable
11S	<i>H. corrugata</i>	saludable
12S	<i>H. fulgens</i>	saludable
1E	<i>H. fulgens</i>	con SDA
2E	<i>H. corrugata</i>	con SDA
3E	<i>H. corrugata</i>	con SDA
4E	<i>H. corrugata</i>	con SDA
5E	<i>H. fulgens</i>	con SDA
6E	<i>H. fulgens</i>	con SDA
7E	<i>H. fulgens</i>	con SDA
8E	<i>H. corrugata</i>	con SDA
9E	<i>H. corrugata</i>	con SDA

7.2 Amplificación del gen de la catepsina B y del gen del inhibidor cistatina B por RT-PCR.

Se realizaron extracciones de ARN total de hemolinfa, obteniéndose concentraciones de entre 50 y 100 ng μ L⁻¹ con índice de pureza A260/A280 entre 1.8 y 2 (Tabla VI, Fig. 9). Se preparó ADNc tomando aproximadamente 300 ng de ARN (4 μ L).

Tabla VI. Concentración de ARN y ADNc de hemolinfa de *H. fulgens* y *H. corrugata*.

Muestra	ARNt		ADNc	
	Conc.(ng μ L ⁻¹)	A260/A280	Conc. (ng μ L ⁻¹)	A260/A280
1S	84	1.96	743.4	1.58
2S	63	1.81	765	1.55
3S	62.9	1.77	783.7	1.55
4S	73.2	1.95	880.5	1.58
5S	101.2	1.89	968.5	1.57
6S	79.4	1.96	937.3	1.57
7S	194.2	1.98	1044.8	1.59
8S	132.8	1.99	1039.6	1.58
9S	76.9	1.98	969.6	1.57
10S	103.4	1.96	992	1.58
11S	86.9	1.97	887.3	1.57
12S	81	1.97	938.4	1.58
1E	115.8	1.95	1095.7	1.58
2E	145.9	1.92	766.2	1.55
3E	93.8	1.96	1057.5	1.57
4E	115.7	1.92	859.6	1.57
5E	52.4	1.85	749.2	1.56
6E	86.2	1.95	953	1.58
7E	102.3	1.95	993.9	1.58
8E	49.8	1.88	725.9	1.55
9E	110.2	1.93	977.3	1.59

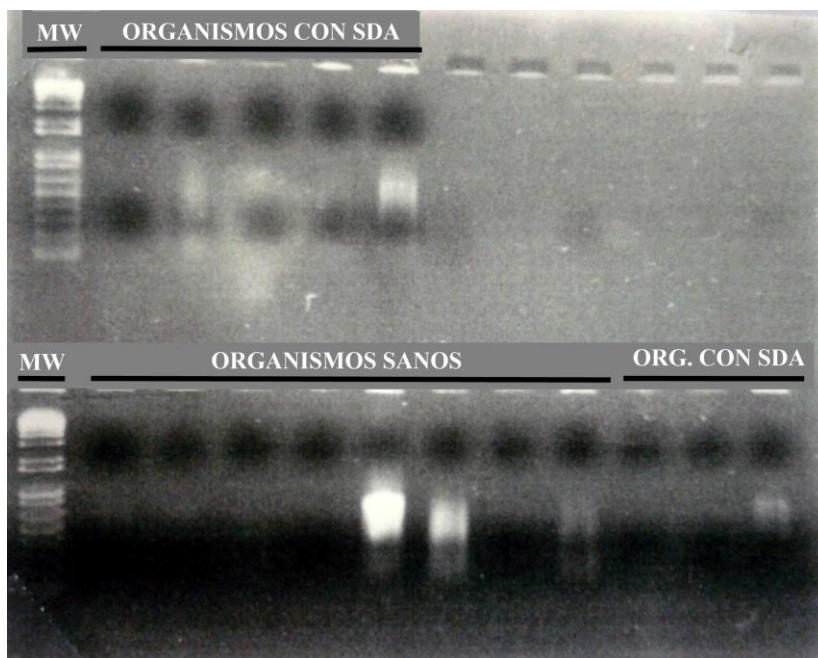


Figura 9. Perfil electroforético de ARN de hemolinfa de *H. fulgens* y *H. corrugata* en gel de agarosa 1%/TBE-DEPC 1X. MW: marcador de peso molecular 1Kb Plus.

Aunque no fue posible observar las subunidades ribosomales ni definir la integridad del ARN por su baja concentración, se realizó la síntesis de ADNc y PCR de punto final.

7.2.1 PCR punto final para los genes *catB*, *cistB*, *hsp70*, *hsp90*, *rpl5*, *sdh* y *fe1 α*

Con los stocks de ADNc (sección 5.2, 100 ng μ L⁻¹), se realizó un PCR punto final para observar patrones de expresión de los 7 genes (Fig. 10). Como se puede observar en los geles correspondientes a los genes *hsp70* y *hsp90*, no se obtuvieron amplicones, por lo que estas muestras no se analizaron mediante secuenciación.

Se obtuvieron amplicones de ~ 100 pb del gen *cat B* (Fig. 11) para ambas especies, donde el análisis de alineamiento las secuencias del gen catepsina B para *H. fulgens* y *H. corrugata* presentaron una homología del 96% con la secuencia reportada en NCBI de catepsina B de *H. discus hannai* (KC171017.1).

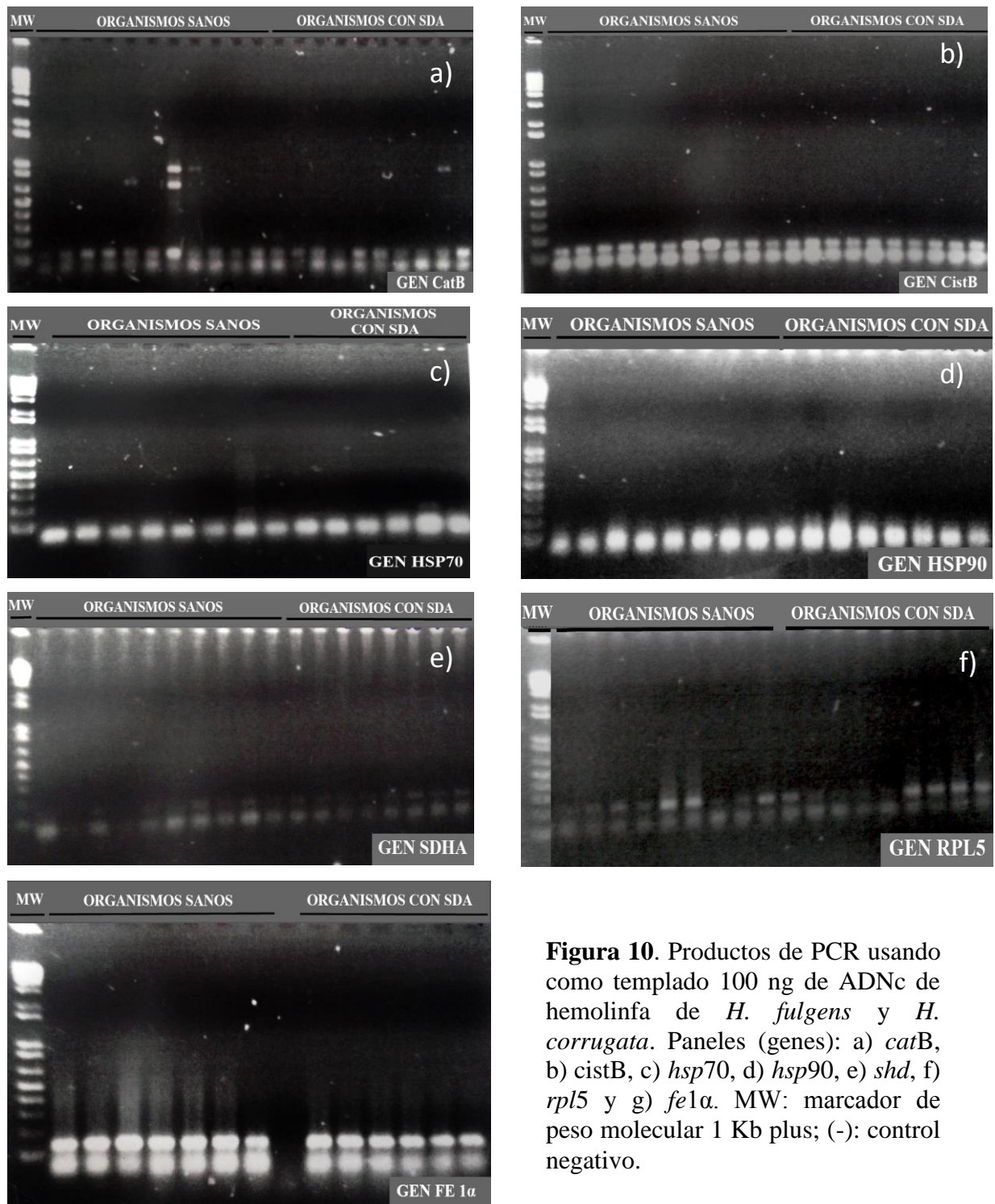


Figura 10. Productos de PCR usando como templado 100 ng de ADNc de hemolinfa de *H. fulgens* y *H. corrugata*. Paneles (genes): a) *catB*, b) *cistB*, c) *hsp70*, d) *hsp90*, e) *shd*, f) *rpl5* y g) *fe1a*. MW: marcador de peso molecular 1 Kb plus; (-): control negativo.

Para el gen *cistB* (Fig. 12), se obtuvieron amplicones de ~140 pb para ambas especies; en el análisis de alineamiento, las secuencias presentaron una homología del 93% con la secuencia reportada de cistatina B para *H. discus discus* (JQ653304.1) en NCBI.

```

Hf -----TCTATGCAGAGGACATGGAAGGCTGGTAGAACTTCCATCCCTCCCTG 48
Hc -----CTATGCAGAGGACATGGAAGGCTGGTAGAACTTCCATCCCTCCCTG 47
Hdd GACAAAATCAACTCTATGCAGAGGACATGGAAGGCTGGTAGAACTTCCATCCCTCCCTG 180

Hf CCCCAGTCCTACTTCAAGCGTCTGTTG----- 75
Hc CCCCAGTCCTACTTCAAGCGTCTGTTG----- 74
Hdd CCCCAGTCTTACTTCAAGCGTCTGTTGGGCGTGTACGACATCAATGGTGAGAGTCAGAGA 240

Hf -----
Hc -----
Hdd CTGAACAATATGCTGCCAAAAAGACACACGACCTGTCCGTGATCAGCCTGCCAGAGAAC 300

```

Figura 11. Alineamiento de secuencias de ADNc de catepsina B. Hdd: *Haliotis discus discus* (GENBANK: KC171017.1), Hf: *Haliotis fulgens* y Hc: *Haliotis corrugata*.


```

Hdd TAAACGAAGATGTCGATGTGTGG-----TGGTGCAACCGAAGTGAAATC-----TGC 1547
Hf -----GTGG-----TGGTGCAACCGAAGTGAAATC-----TGC 28
Hc -----CAGAGCCCAKRCSGGGAAATTTAGSGAGATCAAAGAAAAGTTGATYGYGT 51

Hdd AACAGAA-GAAGTGCAA---AACTCT-----GTAATGAGGTGAGAGTG 1587
Hf AACAGCA-GAAGTGCAAG---AACTCT-----GTAATAAGGT----- 61
Hc TCCGGCAAGAAGCKGGAGGAAAACCCCAAAGTGTCAAGTCTGGTGTGWAGCCATGATT 111

Hdd CAAC-----TGTGCAAGTGTCTGATGTAGACGAGTGGACGGATGTTG-----TGAG 1633
Hf -----TCG-----AGAG 68
Hc CTMCGCACATGGRCCAATAAAGTTTGGCGGCACCTGAATACTATCAGATGAACACAGAK 171

Hdd CCCCTGATGCGGAAATCTGATAGCAATATGIATCCTGTCTCAGTGTAGATGGCTGCAGC 1693
Hf -----GC 70
Hc -----AY 173

Hdd CTTGCCGGGTCTTGTCTTGACTGTTGTCAACGCCATACCCATCAGTGTAGATGGCTGCAG 1753
Hf CTTGC----- 75
Hc CATGATYG----- 181

Hdd CCTTGTGGATCTTGTTTGACTGTTGTCAATGCCATGCCATCAATGTTCGATGGCTGCAG 1813
Hf -----
Hc -----

Hdd CCTTGCCGGGTCTTGTCTTGCTAAAATCTACTTCAAACCCGAGAAGATCTGTGTTAGAAT 1873
Hf -----AAAGA----- 80
Hc -----AMARAATCAACT----- 193

Hdd AGGTCTTCATCAA-GCCATGCTTGACGTAAGAGGC---GAAGTCTACGTGTTTGAATAC 1929
Hf -----CAA-GC-----AGGA-GAAG----- 93
Hc -----CWATGC-----AGAGGACAKGAAGGCTGGTAGAA----- 222

```

Figura 12. Alineamiento comparativo de secuencias de ADNc de cistatina B. Hdd: *Haliotis discus discus* (GENBANK: JQ653304.1), Hf: *Haliotis fulgens* y Hc: *Haliotis corrugata*.

7.3 qPCR

Durante la estandarización de la técnica para el amplificar el gen de la *catB*, se amplificaron, también, productos no específicos (Fig. 13), por lo que hubo que diseñarlos nuevamente utilizando la secuencia de nucleótidos obtenida (Figs. 11 y 12) para obtener

fragmentos de aproximadamente 90 pb (catB025F y catB122R, Tabla III), lo que hace más eficiente la amplificación y el análisis de expresión evitando la formación de otras señales de expresión, tal y como se muestra en las figuras 14-18.

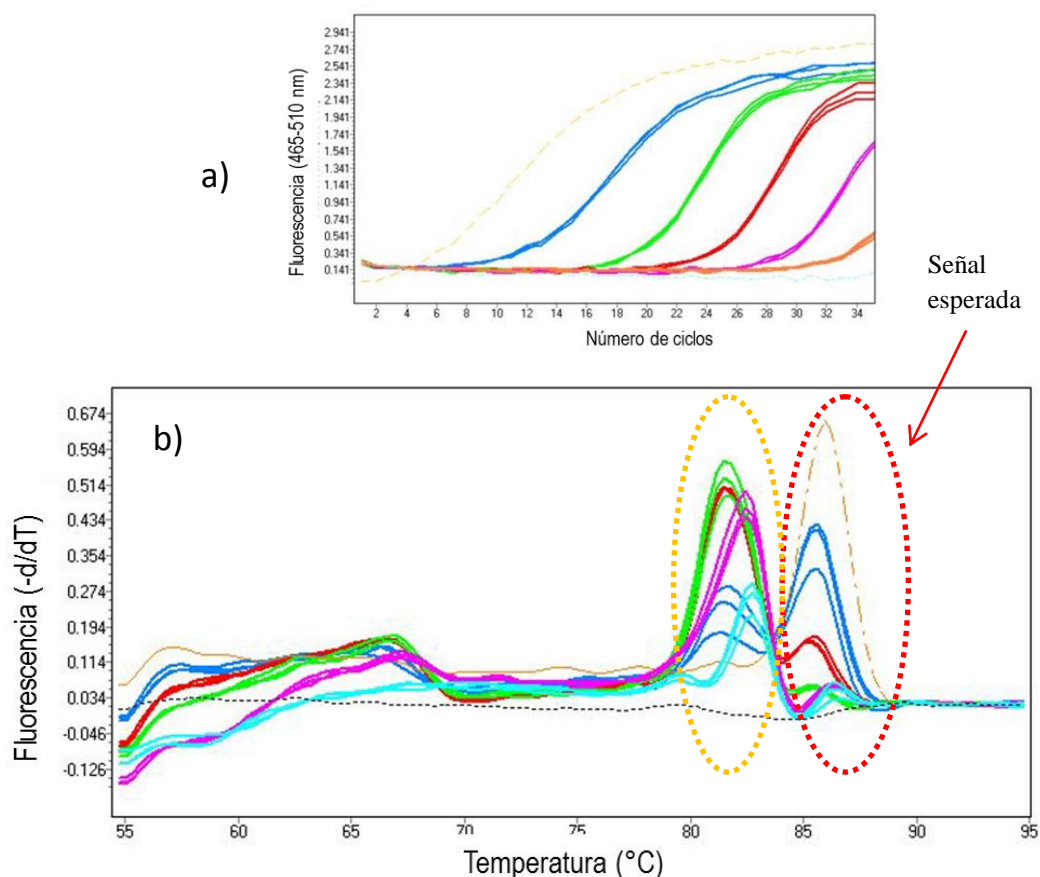


Figura 13. Expresión génica de *catB*; a) Curva estándar, b) Puntos de fusión.

Con este nuevo set de oligos se realizó la estandarización y las curvas estándar, obteniéndose diferentes porcentajes de eficiencia y demostrando que en cada reacción de PCR en tiempo real se obtuvo un solo producto (sin amplificaciones no específicas; datos no mostrados). Para el gen *catB*, se obtuvo una curva estándar con una eficiencia de 92.7% (Fig. 14), para el gen *cistB* la eficiencia fue del 94.4% (Fig. 15), para el gen *sdh* 94% (Fig. 16), para *rpl5* 92.7% (Fig. 17) y para el gen *felA* la eficiencia de la curva fue del 96.7% (Fig. 18).

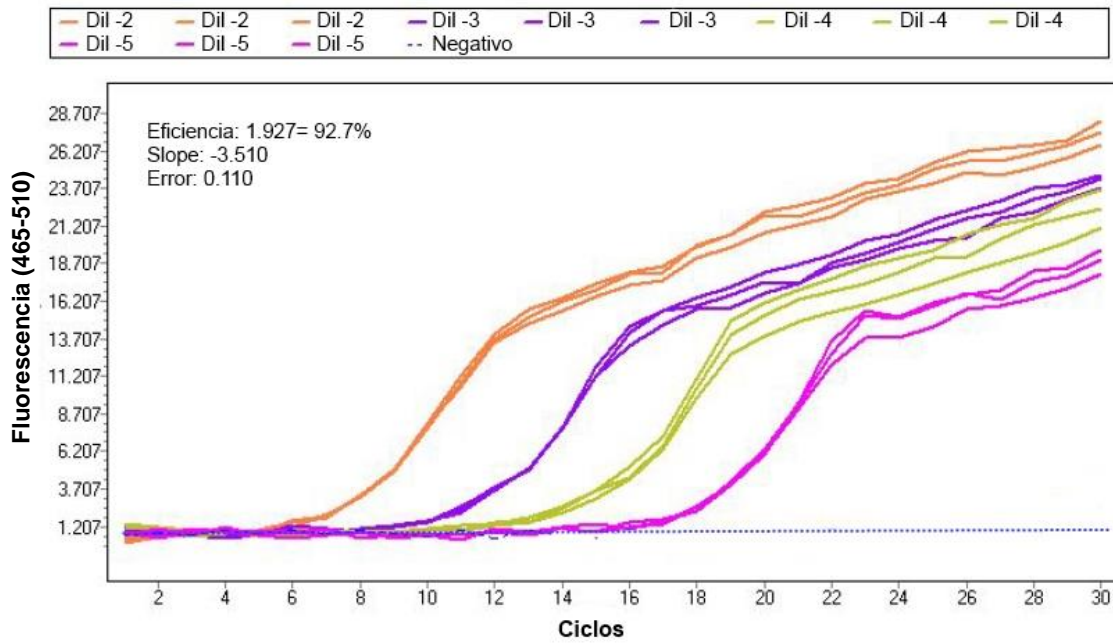


Figura 14. Curva estándar de la expresión génica de *catB*.

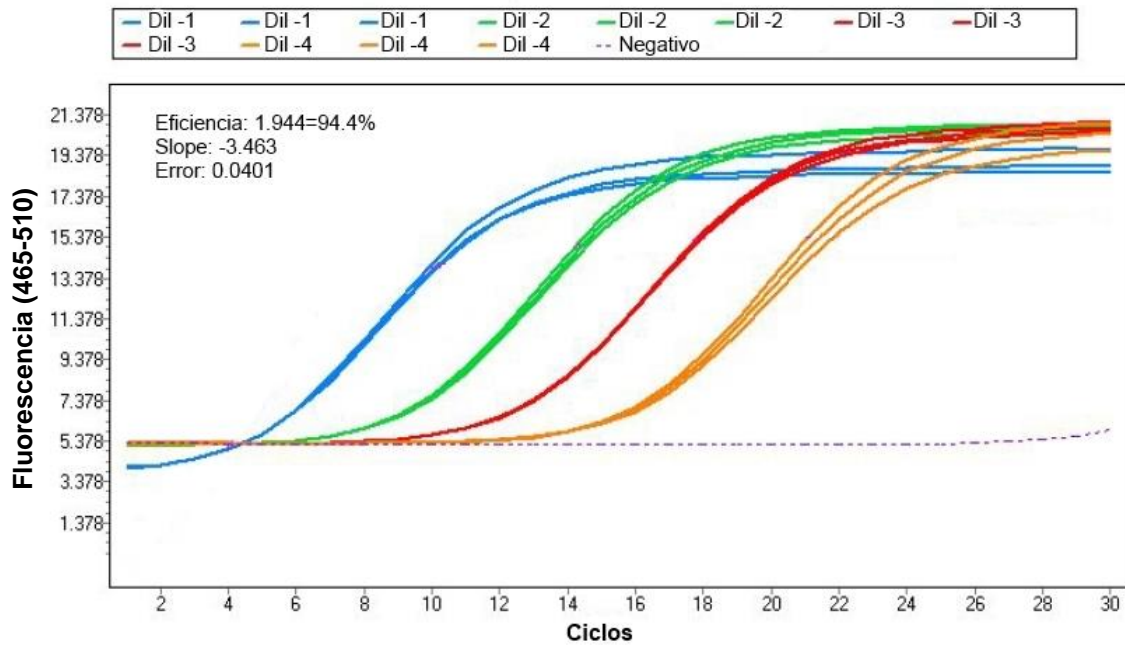


Figura 15. Curva estándar de la expresión génica de *cystB*.

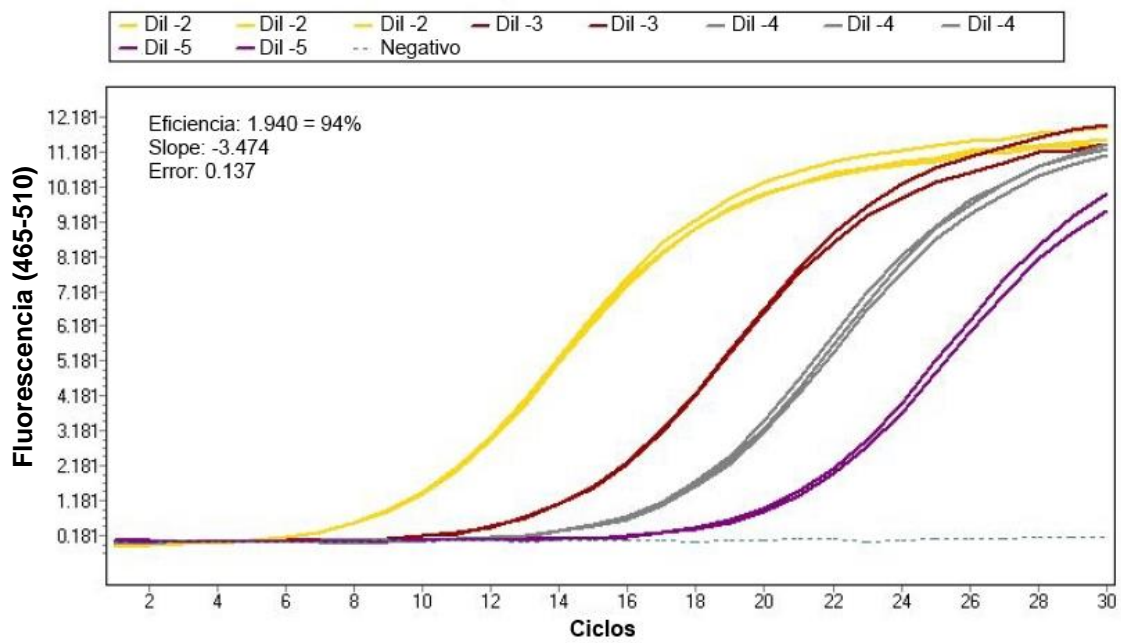


Figura 16. Curva estándar de la expresión génica de *sdh*.

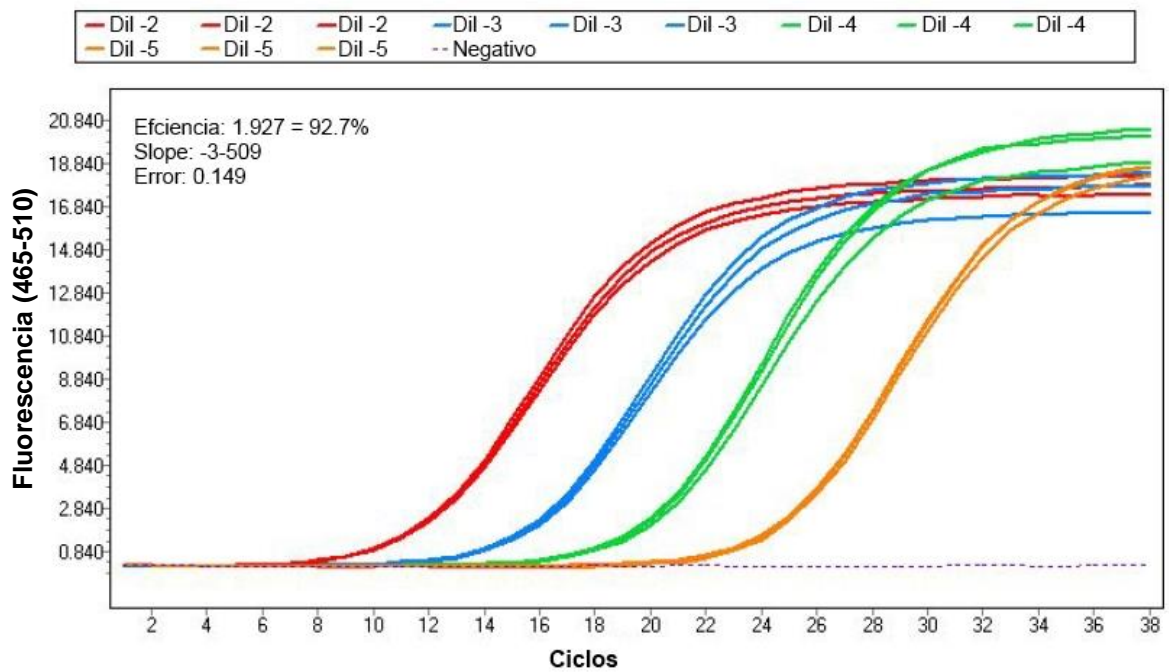


Figura 17. Curva estándar de la expresión génica de la *rp15*.

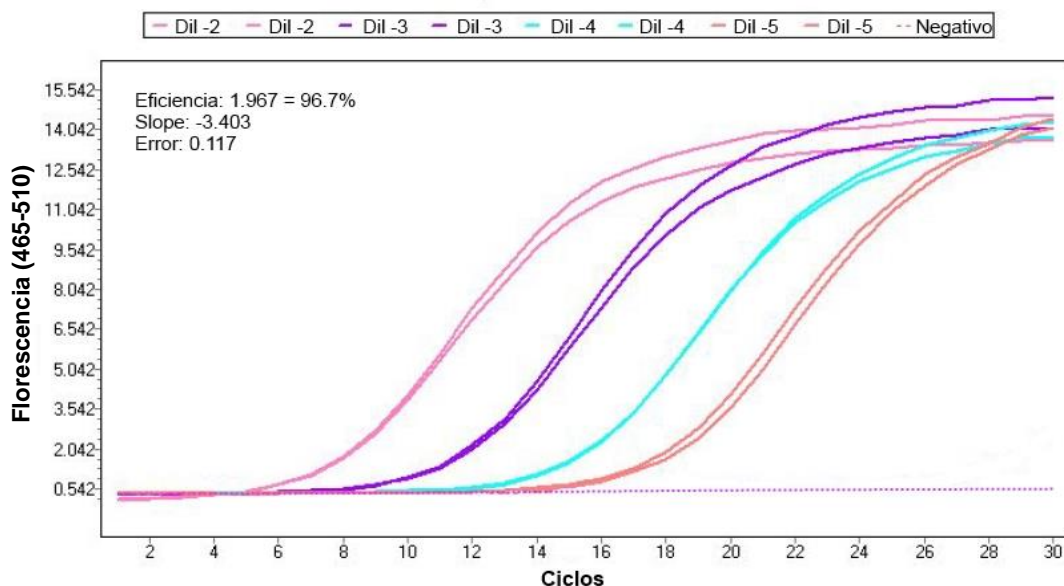


Figura 18. Curva estándar de la expresión génica del *fe1a*.

Una curva estándar con una eficiencia mayor al 90% proporciona mayor confiabilidad en los datos analizados utilizando como base las curvas estándar. Como las curvas se realizaron a partir de productos de PCR purificados (de concentración conocida) se estimó el número de copias de cada gen y grupo de muestras (Tabla VII), usando como base la concentración del fragmento, el peso de los nucleótidos (650 ng) y el tamaño del fragmento amplificado (pb), al aplicar la fórmula (2). Con concentraciones conocidas de ADN y los C_p de cada par de oligos-gen, se realizó la validación de los genes de referencia propuestos, obteniendo mediante el análisis con Normfinder y Bestkeeper, resultando el *rpl5* el gen de referencia con mayor eficiencia y confiabilidad (Tablas VIII y IX).

Tabla VII. Promedio de número de copias para cada gen por set de muestras.

Muestra	Gen				
	<i>catB</i>	<i>cistB</i>	<i>sdh</i>	<i>rpl5</i>	<i>fe1a</i>
Hfs	35,466.67	32,466.67	436.33	8,213.33	15,353.33
Hcs	15,462.33	32,533.33	82.40	1,096.67	2,076.33
Hfe	42,733.33	457,000.00	44.20	4,706.67	3,785.00
Hce	49,600.00	57,266.67	35.70	3,883.33	1,926.00

Notas: Hfs: organismos saludables de *H. fulgens*; Hcs: organismos saludables de *H. corrugata*; Hfe: organismos con RLP de *H. fulgens*; Hce: organismos con RLP de *H. corrugata*.

Tabla VIII. Análisis estadístico para *sdh*, *rpl5* y *fe1 α* con el programa Normfinder.

Gen	Valor de estabilidad	Error estándar	Gen de referencia <i>rpl5</i>
<i>sdh</i>	0.053	0.016	
<i>rpl5</i>	0.026	0.023	
<i>fe1α</i>	0.061	0.016	

Tabla IX. Análisis estadístico para *sdh*, *rpl5* y *fe1 α* con el programa Bestkeeper.

	<i>sdh</i> HKG 1	<i>rpl5</i> HKG 2	<i>fe1α</i> HKG 3
N	12	12	12
Media geométrica [CP]	31.83	27.09	26.69
Media aritmética [CP]	31.87	27.12	26.78
Mínima [CP]	28.94	25.74	23.20
Máxima [CP]	33.84	28.97	29.86
Desviación estándar [\pm CP]	1.32	0.96	1.87
Coefficiente de varianza [% CP]	4.16	3.54	7.00
Mínima absoluta [x-fold]	-7.42	-2.55	-11.24
Máxima absoluta [x-fold]	4.02	3.68	9.00
Desviación estándar absoluta [\pm x-fold]	2.50	1.95	3.67
Coefficiente de correlación. [r]	0.668	0.844	0.906
Valor <i>p</i>	0.018	0.001	0.001

Se usó el gen *rpl5* para realizar los análisis de expresión (Livak y Schmittgen, 2001) y normalizar los datos de las tasas de transcripción de los genes *catB* (Tabla X) y *cistB* (Tabla XI).

En la figura 19 se muestra la representación gráfica de la expresión del gen *catB* en organismos sanos y con SDA de *H. fulgens*, donde se observa el aumento de la expresión.

Tabla X. Análisis de la expresión del gen *catB* en muestras de ADNc de hemolinfa de organismos sanos y enfermos de *H. fulgens* y *H. corrugata*, mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_p}$.

MUESTRA	ESPECIE	GEN	CONDICION	C _P	C _P (prom)	$2^{-\Delta\Delta C_p}$
Hfs	<i>H. fulgens</i>	<i>catB</i>	saludables	29.21	29.21	1
Hfs	<i>H. fulgens</i>	<i>catB</i>	saludables	28.83	29.21	1.18099266
Hfs	<i>H. fulgens</i>	<i>catB</i>	saludables	28.67	29.21	1.47426922
Hfe	<i>H. fulgens</i>	<i>catB</i>	con SDA	28.74	29.21	2.54912125
Hfe	<i>H. fulgens</i>	<i>catB</i>	con SDA	28.50	29.21	2.90794503
Hfe	<i>H. fulgens</i>	<i>catB</i>	con SDA	28.59	29.21	2.51402675
Hcs	<i>H. corrugata</i>	<i>catB</i>	saludables	29.57	29.57	1
Hcs	<i>H. corrugata</i>	<i>catB</i>	saludables	29.21	29.57	1.29235283
Hcs	<i>H. corrugata</i>	<i>catB</i>	saludables	29.51	29.57	0.92018765
Hce	<i>H. corrugata</i>	<i>catB</i>	con SDA	28.37	29.57	0.69737183
Hce	<i>H. corrugata</i>	<i>catB</i>	con SDA	28.40	29.57	0.75785828
Hce	<i>H. corrugata</i>	<i>catB</i>	con SDA	28.38	29.57	0.4061262

Tabla XI. Análisis de la expresión del gen *cistB* en muestras de ADNc de hemolinfa de organismos sanos y enfermos de *H. fulgens* y *H. corrugata*, mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_p}$.

MUESTRA	ESPECIE	GEN	CONDICION	C _P	C _P (prom)	$2^{-\Delta\Delta C_p}$
Hfs	<i>H. fulgens</i>	<i>cistB</i>	saludables	25.22	25.22	1
Hfs	<i>H. fulgens</i>	<i>cistB</i>	saludables	25.34	25.22	0.83508792
Hfs	<i>H. fulgens</i>	<i>cistB</i>	saludables	25.33	25.22	0.93952275
Hfe	<i>H. fulgens</i>	<i>cistB</i>	con SDA	21.32	25.22	27.474094
Hfe	<i>H. fulgens</i>	<i>cistB</i>	con SDA	21.36	25.22	25.8125363
Hfe	<i>H. fulgens</i>	<i>cistB</i>	con SDA	21.31	25.22	24.5900029
Hcs	<i>H. corrugata</i>	<i>cistB</i>	saludables	25.24	25.24	1
Hcs	<i>H. corrugata</i>	<i>cistB</i>	saludables	25.23	25.24	1.01395948
Hcs	<i>H. corrugata</i>	<i>cistB</i>	saludables	25.41	25.24	0.7845841
Hce	<i>H. corrugata</i>	<i>cistB</i>	con SDA	24.42	25.24	0.53588673
Hce	<i>H. corrugata</i>	<i>cistB</i>	con SDA	24.44	25.24	0.58641747
Hce	<i>H. corrugata</i>	<i>cistB</i>	saludables	24.47	25.24	0.30354872

En la figura 20 se muestra la representación gráfica de la expresión del gen *cistB* en organismos sanos y con SDA de *H. fulgens*, donde se observa un aumento significativo y marcado en la expresión del gen en los organismos con SDA.

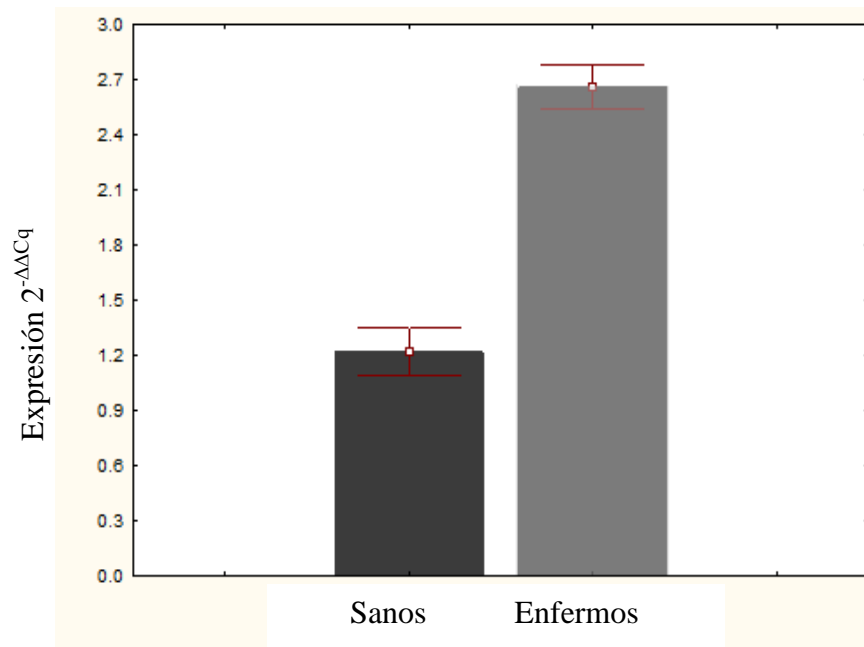


Figura 19. Representación gráfica de los cambios de expresión en el gen *catB* en hemolinfa de *H. fulgens*. ($P < 0.05$)

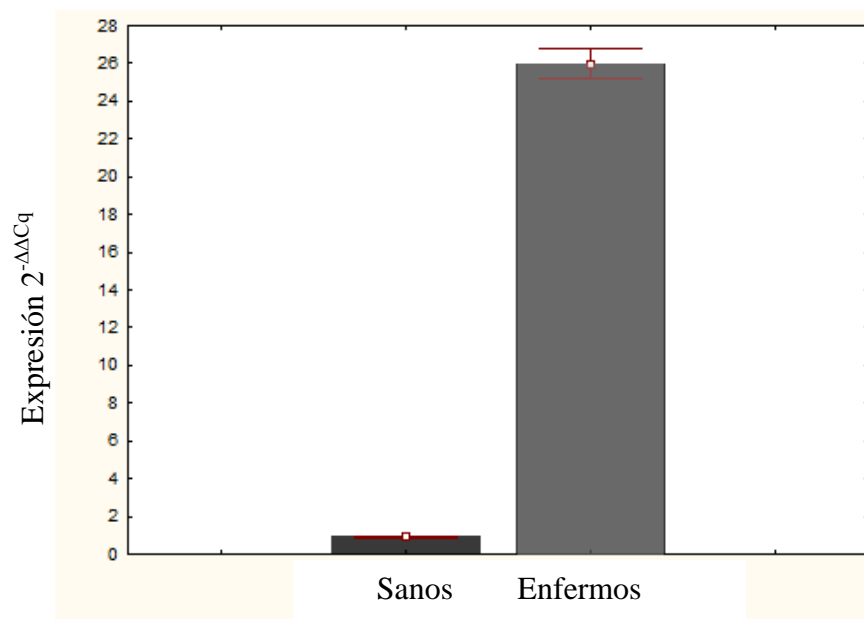


Figura 20. Representación gráfica de los cambios de expresión en el gen *cistB* en hemolinfa de *H. fulgens*. ($P < 0.05$)

Sin embargo en la figura 21 se muestra la representación gráfica de comparación de la expresión de los genes *catB* y *cistB* en organismos sanos y con SDA de *H. fulgens*. En esta gráfica se puede observar un aumento considerable en la expresión del genes de *catB* y *cistB* en organismos enfermos (Hfe) (con SDA) en comparación con la expresión en observada en organismos saludables (Hfs) (sanos).

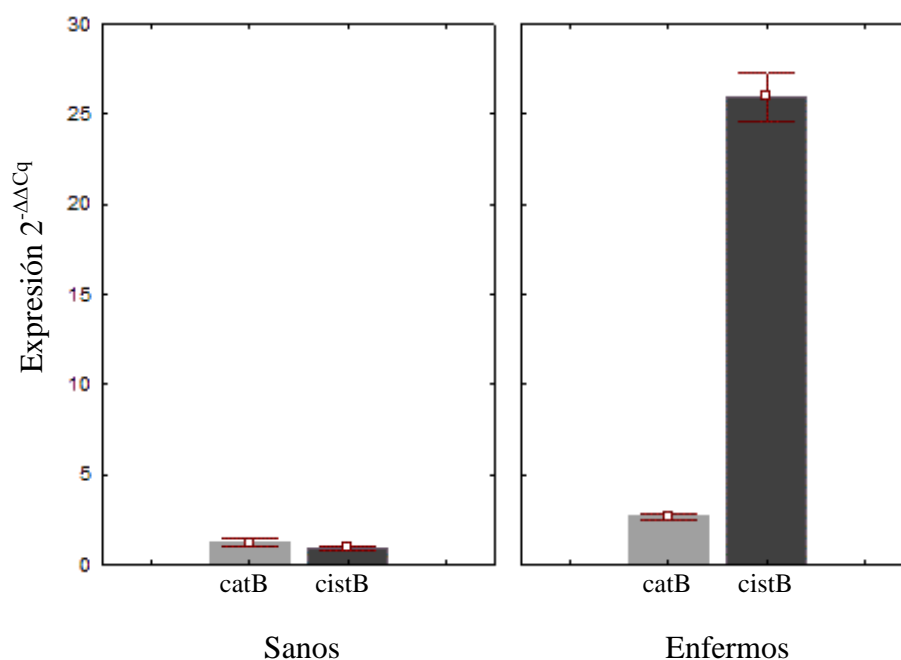


Figura 21. Representación gráfica de los cambios de expresión en genes *catB* y *cistB* en hemolinfa de *H. fulgens* de acuerdo a su condición. ($P < 0.05$)

En la figura 22 se muestra la representación gráfica de la expresión del gen *catB* en organismos sanos y con SDA de *H. corrugata*, donde se observa una alta expresión del gen en los organismos sanos.

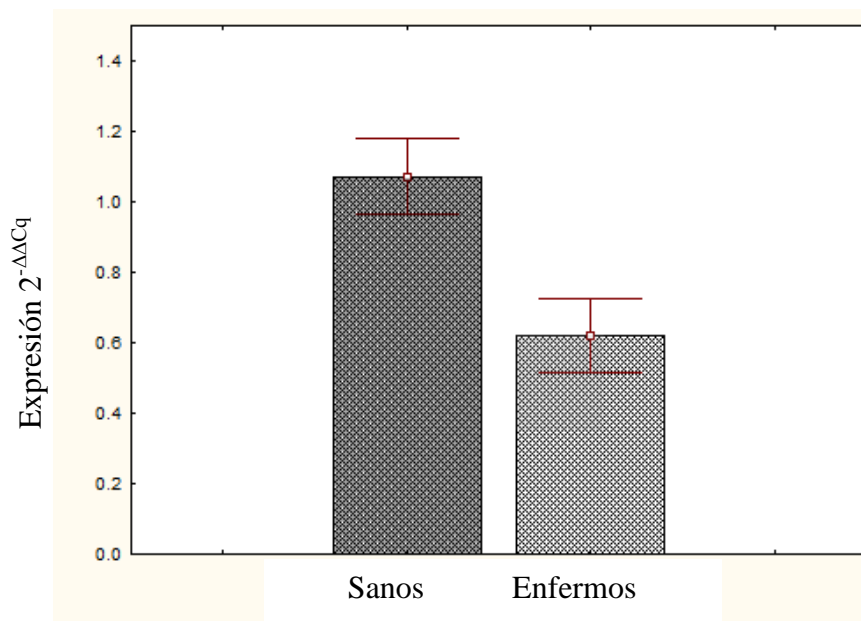


Figura 22. Representación gráfica de los cambios de expresión en el gen *catB* en hemolinfa de *H. corrugata*. ($P < 0.05$)

En la figura 23 se muestra la representación gráfica de la expresión del gen *cistB* en organismos sanos y con SDA de *H. corrugata*, donde se observa una alta expresión del gen en los organismos sanos.

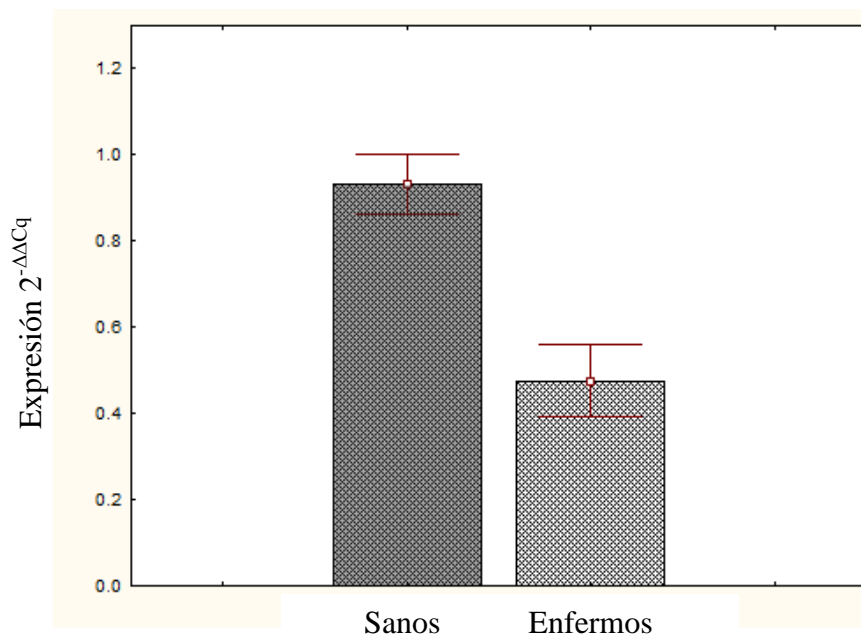


Figura 23. Representación gráfica de los cambios de expresión en el gen *cistB* en hemolinfa de *H. corrugata*. ($P < 0.05$)

En la figura 24 se presentan los mismos resultados que la figura 21 solo que para *H. corrugata*. En este caso, a diferencia de lo observado en *H. fulgens*, se observa una mayor expresión de los dos genes en organismos saludables.

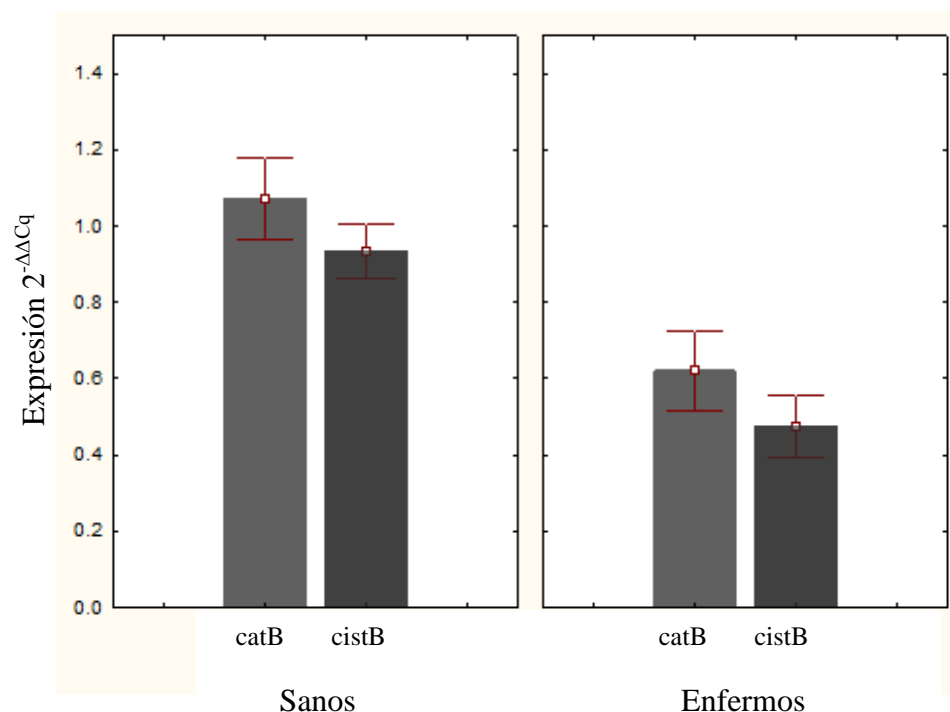


Figura 24. Representación gráfica de los cambios de expresión en genes *catB* y *cistB* en hemolinfa de *H. corrugata* de acuerdo a su condición. ($P < 0.05$)

7.4 ANOVA 2 vías

Con los datos normalizados con el gen *rpl5* y utilizando el método de $2^{-\Delta\Delta Cq}$, con el fin de observar el comportamiento de la expresión de los genes de manera individual, se realizó un análisis de varianza de 1 vía (datos no mostrados) por especie para cada gen y determinar si existían diferencias de acuerdo a las condiciones de salud de los organismos, donde para los dos genes y especies se consideró como hipótesis nula (H_0) que “no existen diferencias entre condiciones” y como hipótesis alternativa (H_a) que “existen diferencias significativas entre condiciones”.

En la especie de *H. fulgens*, la expresión del gen *catB* presentó diferencias significativas entre organismos sanos y con SDA aceptándose H_a . Posteriormente mediante un análisis *post-hoc*, se consideró como H_0 que “los organismos sanos presentaban una mayor expresión del gen que los organismos con SDA” y como H_a que “los organismos con SDA

presentaban una mayor expresión del gen debido a la infección”, finalmente los resultados del análisis mostraron una diferencia significativa mayor en organismos con SDA, aceptándose la *Ha*. El análisis individual del gen *cistB* para esta especie mostró el mismo patrón, diferencias significativas aceptándose *Ha* y en una análisis *post-hoc* los resultaron mostraron una diferencia significativa mayor en organismos con SDA aceptándose *Ha*.

En la especie de *H. corrugata*, la expresión del gen *catB* presentó diferencias significativas entre organismos sanos y con SDA aceptándose *Ha*. Posteriormente mediante un análisis *post-hoc*, se consideró como *Ho* que “los organismos sanos presentaban una mayor expresión del gen que los organismos con SDA” y como *Ha* que “los organismos con SDA presentaban una mayor expresión del gen debido a la infección”. Finalmente los resultados del análisis mostraron una diferencia significativa mayor en organismos sanos, aceptándose *Ho*. En el análisis de expresión del gen *cistB*, se presentaron diferencias significativas aceptándose *Ha*, sin embargo en el análisis *post-hoc*, las diferencias significativas se presentaron en organismos sanos, aceptándose *Ho*.

Posteriormente, se realizó un análisis de 2 vías para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas en la expresión por condición de salud y entre genes, utilizando condición y gen (*catB* y *cistB*) como variables independientes y el valor de expresión $2^{-\Delta\Delta C_p}$ como variable dependiente. Se consideró como hipótesis nula (*Ho*) que “no existen diferencias entre genes y condiciones” y como hipótesis alternativa (*Ha*) que “existen diferencias entre genes y condiciones”.

El análisis mostró que en *H. fulgens* existen diferencias estadísticamente significativas en la expresión de los genes por condición de salud (Tabla XII), aceptándose *Ha*, por lo que se realizó un análisis *post hoc* para determinar si esas diferencias era mayores o menores entre los genes (Tabla XIII). En este caso se consideró como *Ho* que “como respuesta a la infección provocada por el SDA, el gen que codifica la cistatina B se expresa mas abundantemente que el gen de la catepsina B” y como *Ha* que “durante un proceso infeccioso provocado por el SDA los niveles de expresión del gen que codifica la son menores que los observados en el gen de la catepsina B”. Finalmente, mediante este análisis se determinó que hay diferencias en la expresión de los genes, resultando

significativamente mayor la expresión del gen de *cistB* que la expresión de *catB*, por lo tanto, se acepta la *H₀*.

En el caso de *H. corrugata*, el análisis de varianza determinó que no existen diferencias estadísticamente significativas en la expresión de los genes evaluados por condición de salud (Tabla XIV), por lo que no fue necesario realizar un análisis *post hoc*.

Tabla XII. ANOVA de 2-vías de *H. fulgens* entre *catB* y *cistB*

	Suma de cuadrados	GL	Promedio de cuadrados	F	P	
Intercepto	709.5963	1	709.5963	1285.892	0.000000	
Gen	397.0363	1	397.0363	719.488	0.000000	
Condición	525.5996	1	525.5996	952.464	0.000000	
Gen*Condición	417.5571	1	417.5571	756.675	0.000000	Significativo
Error	4.4147	8	0.5518			

Tabla XIII. Análisis *post hoc*. Prueba de Tukey para *H. fulgens*. Error: Entre promedios de cuadrados = 0.55183

	Gen	Condición	{1}	{2}	{3}	{4}
1	<i>catB</i>	Saludable		0.160601	0.960585	0.000231
2	<i>catB</i>	con SDA	0.160601		0.081626	0.000231
3	<i>cistB</i>	Saludable	0.960585	0.081626		0.000231
4	<i>cistB</i>	con SDA	0.000231	0.000231	0.000231	

Tabla XIV. ANOVA de 2-vías de *H. corrugata* entre *catB* y *cistB*

	Suma de cuadrados	GL	Promedio de cuadrados	F	P	
Intercepto	7.204855	1	7.204855	254.9240	0.000000	
Gen	0.060138	1	0.060138	2.1278	0.182763	
Condición	0.618291	1	0.618291	21.8765	0.001588	
Gen*Condición	0.000039	1	0.000039	0.0014	0.971446	No significativo
Error	0.226102	8	0.028263			

8. DISCUSIÓN

A la fecha se ha reportado el uso de una gran variedad de genes como control para análisis de expresión a nivel de transcripción, donde se utilizan con mayor frecuencia genes que codifican proteínas como la actina o la tubulina, que corresponden a proteínas estructurales del citoesqueleto (Suzuki et al., 2000; de Jonge et al., 2007). Sin embargo, se ha demostrado que estos genes también pueden presentar cambios en la expresión bajo diversas condiciones (Wan et al., 2011), por lo que se considera necesaria la validación de los genes de referencia bajo las condiciones experimentales aplicadas (Logan et al., 2009). En este estudio, se analizó la expresión de tres genes de referencia basados en los genes reportados por Wan et al. (2011) en estudios realizados para determinar el efecto de disruptores químicos endocrinos en *H. discus discus*. En dicho estudio se analizaron 25 genes (incluyendo tubulina y actina) y se determinó que la expresión de los genes que codifican para la proteína ribosomal L5, la succinato deshidrogenasa y el factor de elongación 1 α mostraban mayor estabilidad ante la exposición de los organismos a tributilina y 17 α -etinilestradiol por lo que se consideraron como genes de referencia para este tipos de estudios. Con base en el estudio de Wan et al. (2011) en el presente estudio se evaluaron los tres genes en *H. fulgens* y *H. corrugata*, y se observó que el gen con mayor estabilidad (tanto en organismos saludables como en organismos con SDA) fue el que codifica para la proteína ribosomal L5, lo implica que este gen mantiene niveles de expresión relativamente estables bajo las condiciones definidas en nuestro estudio, y para que pudiera observarse variación tendría que haber un error en el ensamblaje de los ribosomas ya que forma parte de la subunidad 60S del ribosoma eucariótico (Frigerio et al., 1995). Por ejemplo, si existiera una incapacidad de unirse correctamente o pérdida de un factor de síntesis pueden causar la producción de ribosomas erróneos (Lafontaine et al., 1995) lo que generaría variaciones en la expresión del gen *rpl5*.

Las proteasas desempeñan una variedad de funciones dentro de los procesos metabólicos y de absorción de nutrientes así como de ataque ante infecciones parasitarias, también son agentes importantes para evitar los efectos de agentes tóxicos sobre los huéspedes, ya sea

sirviendo directamente como toxina o en la activación proteolítica de toxinas no proteicas. Sin embargo, hay proteasas que actúan más allá de su función fisiológica y que pueden infligir graves daños en los tejidos. Uno de los dispositivos importantes para regular las proteasas y reducir la posibilidad de daños colaterales es la actividad de un conjunto diverso de inhibidores de proteasas en los fluidos (Armstrong, 2001). En moluscos, se ha observado la presencia de un sistema de defensa que protege ante la invasión de patógenos, dentro del que se incluyen las enzimas lisosomales (Tisca y Mosca, 2004). En este grupo, se han descrito catepsinas y cistatinas, que a través de la inhibición activación regulan parte de la respuesta inmune innata. En este trabajo, el análisis de los datos de expresión mostró un comportamiento simultaneo (relacionado) de los dos genes (*catB* y *cistB*). En los abulones de la especie *H. fulgens*, los niveles de transcritos, al estar bajo un proceso infeccioso, se modifican: se observa un aumento en la expresión del gen de cistatina B muy posiblemente como mecanismo de protección celular al evitar autólisis por exceso de catepsina B en algún punto de la infección y lo que se observa es el control de la expresión de este gen, aunque en el análisis individual si se observa un aumento en los niveles de transcritos del gen catepsina B. En el caso de *H. corrugata* no se observaron cambios significativos en la expresión de ambos genes, sin embargo, al realizar el análisis individual, se detectaron cambios en la expresión de acuerdo a las condiciones de sanos y con SDA, aunque para ambos genes la expresión fue mayor siempre en organismos sanos, esto quizás porque la expresión ya había disminuido y estos transcritos habían servido para el proceso inflamatorio que se observó en los organismos con SDA.

Se ha reconocido que entre otras funciones, la catepsina B participa como parte del sistema inmune en el proceso de fagocitosis, cuya actividad debe de ser regulada, por inhibidores como cistatinas. Sin embargo, hasta la fecha no hay trabajos específicos que relacionen la actividad de esta proteína y del inhibidor.

Se ha reportado que cuando un organismo se encuentra sometido a un proceso infeccioso, los patrones de expresión de catepsina B se modifican a través del tiempo. Sin embargo, los reportes sobre la catepsina B en moluscos son aún escasos. Qiu et al. (2013) reportaron la presencia y regulación de la expresión de catepsina B cuando los organismos de *H. discus hannai* se encontraban infectados con *V. anguillarum* (bacteria gram negativa, como *X.*

californienses utilizada en el presente estudio), donde la mayor expresión del gen ocurrió en hemocitos entre las 3 y 48 hpi, lo que indica que tiene una alta participación en la respuesta inmune ya que el proceso de fagocitosis estaría participando en las primeras horas de infección, disminuyendo posteriormente su actividad dando paso a otro proceso como la activación de la respuesta inflamatoria. En este trabajo, se observó que la expresión de este gen en *H. fulgens* es mayor en organismos con SDA que en organismos sanos. Contrario a este comportamiento, se observó que para *H. corrugata* la expresión de catepsina B en organismos con SDA disminuye significativamente en comparación con organismos saludables, esto indicaría una menor actividad de fagocitosis, que podría ser el resultado de un proceso de infección más avanzado, aunque también podría sugerir su participación en otros procesos de señalización además de procesos de fagocitosis como activación de los receptores Toll (Conus y Simon, 2010).

En diversos organismos se ha reportado la presencia de cistatina B como parte del sistema inmune innato, como por ejemplo en la sanguijuela *Theromyzon tessulatum* donde se observó un incremento de la actividad cuando se infectó experimentalmente con *Escherichia coli* y *Micrococcus luteus* (Lefebvre et al., 2004). En el cangrejo chino de mitones (*Eriocheir sinensis*) infectado con *Listonella anguillarum* también se observó un incremento en la expresión del gen de la cistatina B (Li et al., 2010b), así como en la almeja manila, *Ruditapes philipinarum* bajo infección con la bacteria gram-negativa *V. tapetis* (presentó una mayor expresión y actividad de cistatina B principalmente en hemocitos) (Premachandra et al., 2013). En las tres especies se reportó este gen y la actividad enzimática de la proteína como parte del sistema inmune en los procesos de defensa, y como control de actividad de cisteín proteasas, sin embargo, la conclusión no fue fuertemente soportada, ya que en estos trabajos solo se evaluó este gen.

Premachandra et al. (2012) reportan que en organismos sanos de *H. discus discus*, el gen cistatina B tiene una mayor expresión en hemocitos, sin embargo, una vez que se ha iniciado el proceso de infección por la bacteria *V. parahemolyticus* las mayores tasas de expresión del gen se observan a las 6 h y su expresión disminuye gradualmente. En el presente trabajo se observaron cambios en la expresión de la cistatina en *H. fulgens* en función de su condición (sanos o enfermos). Sin embargo, es difícil evaluar el tipo y forma

de la respuesta ya que se desconoce el tiempo de infección, puesto que los organismos colectados ya presentaban signos de SDA lo que se traduce en un tiempo considerable desde el inicio de la infección, cuando el proceso de fagocitos podría ya haber tenido su máxima actividad y, por lo tanto, la respuesta inmune pudiera estar en un estado avanzado, como por ejemplo en plenos procesos inflamatorios y de respuestas más específicas para combatir la infección. Así mismo, dentro de las respuestas avanzadas en organismos infectados, es posible que la catepsinas activen las vías de señalización de los receptores tipo Toll para la producción de antígenos específicos, con esto también se esperaría una disminución en la expresión del gen de cistatina B llegado el punto donde ya se empiezan a activar otras vías para evitar que la actividad de las catepsinas sea interrumpida. No obstante, también es importante considerar que existen agentes patógenos que producen catepsina B para facilitar la infección en el hospedero, como el gusano *Fasciola hepatica* donde la producción de catepsina B por parte de este gusano, le permite la invasión y migración evitando o neutralizando así el efecto de la catepsina B propia del hospedero (Beckham et al., 2009). En este trabajo, dado que la expresión del gen de cistatina B en *H. fulgens* aumentó significativamente en organismos con SDA y puesto que la expresión de la catepsina B no se incrementó de forma paralela, se podría considerar la posibilidad de que la bacteria *Xenohaliotis californiensis* produzca catepsina B que le facilite su establecimiento en el tracto digestivo de los abulones, por lo que el incremento significativo en la expresión del gen cistatina B podría producir mayor cantidad de proteína para regular la actividad de catepsina B (propia y ajena) para evitar degradación de las células. Aunque en *H. corrugata* no se observó el mismo comportamiento en la expresión de *cistB*, es muy probable que se lleve a cabo de la misma forma ya que son organismos del mismo género, la misma localidad y poseen un sistema inmune similar, sin embargo, las diferencias podrían atribuirse a los tiempos de infección.

Con base al comportamiento de la expresión reportado por otros autores de estos dos genes de estudio, podríamos suponer que *H. corrugata* tiene un período de infección menor, en el que se puede observar la expresión de los genes (debido al desfase), con un comportamiento contrario al que se esperaba, donde es menor la expresión del gen de la

cistatina B en organismos sanos y mayor la del gen catepsina B en los organismos sanos para combatir a la bacteria *X. californiensis* antes de activar otros mecanismos de defensa. Con base en la hipótesis propuesta en este trabajo, donde se establece que los niveles de expresión del gen de cistatina B son mayores que los del gen de catepsina B en organismos saludables, podemos determinar que ocurre lo contrario, aunque si existe una relación entre la expresión de estos genes, posiblemente el gen catepsina B también participe en otros procesos de activación de vías del sistema inmune (Conus y Simon, 2010) por lo que el gen *cistB* controla la actividad de los transcritos de *catB* pero con cierto límite ya que éste tiene otras funciones especiales dentro del sistema inmune además de participar en la fagocitosis.

9. CONCLUSIONES

El análisis de validación de genes de referencia mostró variaciones en la expresión de algunos genes que han sido reportados previamente como estables para el género *Haliotis* (como succinato deshidrogenasa, proteína ribosomal L5 y factor de elongación 1 α). Sin embargo, este estudio demostró que el gen que presenta una mayor estabilidad en su expresión fue el que codifica la proteína ribosomal L5.

El análisis de la expresión de los genes *catB* y *cistB* mostró diferentes comportamientos y niveles de expresión de acuerdo a la especie, lo cual podría ser una respuesta correlacionada con los diferentes períodos de infección por *X. californienses*.

En organismos de *H. fulgens* con SDA, el gen *catB* mostró bajos niveles de expresión, pero mayores en comparación a aquellos observados en organismos saludables. Mientras que el gen *cistB* mostró niveles de expresión mayores en organismos con SDA en comparación con organismos saludables.

En organismos de *H. corrugata* con SDA los niveles de expresión del gen *catB* fueron menores en comparación con organismos saludables. El nivel de expresión del gen *cistB* fue menor en organismos con SDA comparado con organismos saludables.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la hipótesis de trabajo en la que se establece que la abundancia de transcritos del gen de la catepsina B en organismos saludables de abulón azul *H. fulgens* y abulón amarillo *H. corrugata*, será menor que la del gen que codifica a su inhibidor, cistatina B, se rechaza y se puede concluir que los niveles de expresión del gen de *catB* son mayores que los del gen *cistB*, en las diferentes condiciones de los organismos de las dos especies *H. fulgens* y *H. corrugata*, indicando así la relación que existe entre estos genes y que el gen de catepsina B dentro de estas especies también podría tener otras

funciones importantes que ayudan a la defensa y mantenimiento del equilibrio de las células de los organismos.

Por lo anterior se sugiere un mayor análisis de la expresión de estos genes para determinar otras posibles vías de señalización en las que se encuentren implicados

10. BIBLIOGRAFÍA

- Armstrong, P. 2001. The contribution of proteinase inhibitors to immune defense. *TRENDS in Immunology* 22 (1): 47-52.
- Basto, A. M. 2009. Identificación del sexo y del desarrollo gonadal en abulón rojo *Haliotis rufescens*, en cautiverio. MC Tesis. CICESE. Ensenada, México. 68 pp.
- Beckham, S. A., Piedrafita, D., Phillips, C. I., Samarawickrema, N., Law, R. H. P., Smooker, P. M., Quinsey, N. S., Irving, J. A., Greenwood, D., Verhelst, S. H. L., Bogyo, M., Turk, B., Coetzer, T. H., Wijeyewickrema, L. C., Spithill, T. W. y Pike, R. N. 2006. A major cathepsin B protease from the liver fluke *Fasciola hepatica* has atypical active site features and a potential role in the digestive tract of newly excysted juvenile parasites. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41: 1601-1612.
- Benes, P., Vetvicka, V y Fusek, M. 2009. Cathepsin D- many functions of one aspartic protease. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 68 (1): 12-28.
- Bird, P. I., Trapani, J. A. y Villadangos, J. A. 2009. Endolysosomal proteases and their inhibitors in immunity. *Nature Reviews Immunology* 9: 871-872.
- Bower, S. 2000. Update on emerging abalone diseases and techniques for health assessment. *Journal of Shellfish Research* 22(3): 805-810.
- Braid, B. A. 2004. Biochemical and histologic changes in red abalone (*Haliotis rufescens*) subjected to eight different treatment combinations of exposure to the agent of withering syndrome, water temperature, and food availability. M.S. Thesis, University of California, Davis, USA. 111 pp.
- Brix, K., Dunkhorst, A., Mayer, K. y Jordans, S. 2008. Cystein cathepsin: cellular roadmap to different functions. *Biochimie* 90: 194-207.

- Brömer, D. 2000. Papain-like cysteine proteases. *Current Protocols in Protein Science* 21.2.1-21.2.14.
- Burreson, E. M. 2006. Infección por *Penkinsus olseni*. En: Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos. 5a. http://www.oie.int/esp/normes/fmanual/e_summry.htm. 362-369.
- Bustin, S. A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25: 169-193.
- Cáceres-Martínez, J. 2002. Enfermedades infecciosas en moluscos. Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico. CONAPESCA-UAM. 2 (18): 6-9.
- Cáceres-Martínez, J., Vázquez-Yeomans, R. y Flores-Saib, R. D. 2011. Intracellular prokaryote *Xenohalotis californiensis* in abalone *Haliotis* spp. from Baja California, México. *Ciencia Pesquera* 19 (2): 5-11.
- Chapman, H., Riese, R. y Shi, G-P. 1997. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu. Rev. Physiol.* 59: 63-88.
- Cheng, T. 1975. Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes, *Annals New York Academy of Sciences.* 266: 343-379.
- Ciechanover, A. 2005. Proteolysis: from lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nature Review Molecular Cell Biology* 6: 69-87.
- Colbert, J., Matthews, S. P., Miller, G. y Watts, C. 2009. Diverse regulatory roles for lysosomal proteases in the immune response. *Eur. J. Immunol.* 39: 2955-2965.
- Comczynski, P. y Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
- Conus, S. y Simon, H-U. 2010. Cathepsins and their involvement in the immune responses. *Swiss Med Wkly* 140: 1-8.

- Corbeil, S., McColl, K., Williams, L., Mohammad, I., Hyatt, A., Cramer, S., Fegan, M. y St.J.-Crane, M. 2012. Abalone viral ganglioneuritis: Establishment and use of an experimental immersion challenge system for the study of abalone herpes virus infections in Australian abalone. *Virus Research* 165: 207-213.
- Cox, K. W. 1962. California abalones, family Haliotidae. California Department of Fish and Game. *Fish Bulletin*. (118):1-133.
- de Jonge, H. J. M., Fehrmann, R. S. N., de Bont, E. S. J. M., Hofstra, R. M. W., Gerbens F., Kamps, W. A., de Vries, E. G. E., Van der Zee, A. G. J., te Meerman, G. J. y ter Elst, A. 2007. Evidence Based Selection of Housekeeping Genes. *PLoS ONE* 2 (9): e898.
- Deleury, E., Dubreuil, G., Elangovan, N., Wajnberg, E., Reichhart, J-M., Gourbal, B., Duval, D., Baron, O. L., Gouzy, J. y Coustau, C. 2012. Specific versus non-specific immune responses in an invertebrate species evidenced by a comparative de novo sequencing study. *PLoS ONE* 7 (3): e32512.
- Elston, R. y Lockwood, G. S. 1983. Pathogenesis of vibriosis in cultured juvenile red abalone, *Haliotis rufescens*. *Journal of Fish Diseases* 6: 111-128.
- Farcy, E., Serpentine, A., Fiévet, B. y Lebel J-M. 2007. Identification of cDNAs encoding HSP70 and HSP90 in the abalone *Haliotis tuberculata*: Transcriptional induction in response to thermal stress in hemocytes primary culture. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 146: 540-550.
- Friedman C.S. 2006. Síndrome de marchitamiento de las orejas de mar (infección por *Xenohaliotis californiensis*). In: Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos. 5a. http://www.oie.int/esp/normes/fmanual/e_summry.htm. 370-380.

- Frigerio, J. M., Dagorn., J. C., Iovanna, J. L. Jul 1995. Cloning, sequencing and expression of the L5, L21, L27a, L28, S5, S9, S10 and S29 human ribosomal protein mRNAs. *Biochim Biophys Acta* 1262 (1): 64–8.
- García-Carreño, F., Navarrete del Toro, M., Serviere-Zaragoza, E. 2003. Digestive enzymes in juvenil Green abalone, *Haliotis fulgens*, fed natural food. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 134: 143-150.
- Gardner G. R., Harshbarger J. C., Lake J. L., Sawyer T. K., Price K. L., Stephenson M. D., Haaker P. L. y Togstad H. A. 1995. Association of prokaryotes with symptomatic appearance of withering syndrome in black abalone *Haliotis cracherodii*. *Journal of Invertebrate Pathology* 66: 111–120.
- Grzonka, Z., Jankowska, E., Kasprzykowski, F., Kasprzykowska, R., Lankiewicz, L., Wicz, W., Wieczerek, E., Ciarkowski, J., Drabik, P., Janowski, R., Kozak, M., Jaskólski, M. y Grubb, A. 2001. Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. *Acta Biochimica Polonica* 48: 1-20.
- Haaker P. L., Parker D. O., Togstad H., Richards D. V., Davis G. E. y Friedman C. S. 1992. Mass mortality and withering syndrome in black abalone *Haliotis cracherodii*, in California. In: *Abalone of the World*, Shepard S.A., Tegner M.J. y Guzman del Proo S.A., eds, Blackwell Scientific, Oxford, UK. 214–224.
- Hernández-Santoyo, A., Hernández-Arana, A., Arreguín-Espinosa, R. y Rodríguez-Romero, A. 1998. Purification and characterization of several digestive proteases from the blue abalone, *Haliotis fulgens*. *Aquaculture* 159: 203-216.
- Hooper, C., Hardy-Smith, P. y Handler, J. 2007. Ganglioneuritis causing high mortalities in farmed Australian abalone (*Haliotis laevis* and *Haliotis rubra*). *Australian Veterinary Journal* 85 (5): 189-193.

- Huang, Z-B., Gao, F., Zhao, J., Li, W-D. y Ke, C-H. 2010. Molecular analysis of the intestinal bacterial flora in cage-cultured adult small abalone, *Haliotis diversicolor*. *Aquaculture Research* 41: 760-769.
- Hunt, J.W. y Anderson, B.S., 1989. Sublethal effects of zinc and municipal effluents on larvae of the red abalone *Haliotis rufescens*. *Mar. Biol.* 101, 545–552.
- Iwanaga, S., Luel-Lee, B. 2005. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 38 (2): 128-150.
- Jia, X., Zhang, Z., Wang, G., Zou, Z., Wang, S., Huang, B. y Wang, Y. 2009. Expressed sequence tag analysis for identification and characterization of genes related to Tributyltin (TBT) exposure in the abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Comparative biochemistry and Physiology, Part D* 4: 255-262.
- Kirkegaard, T. y Jäätelä, M. 2009. Lysosomal involvement in cell death and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1793: 746-754.
- Kudo, T., Kigoshi, h., Hagiwara, T., Takino, T., Yamazaki, M. y Yui, S. 2009. Cathepsin G, a neutrophil protease, induces compact cell-cell adhesion in MCF-7 human breast cancer cells. *Mediators of Inflammation* 1:1-7.
- Kubista, M., Andrade, J., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strombom, L., Stahlberg, A. y Zoric, N. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects Method* 27(2-3): 95-125.
- Lafontaine, D., Vandenhaute, J. y Tollervey D. 1995. The 18S rRNA dimethylase Dim1p is required for pre-ribosomal RNA processing in yeast. *Genes Dev.* 9, 2470–2481
- Lebel, J. M., Giard, W., Favrel, P. y Boucaud-Camou, E. 1996. Effects of different vertebrate growth factors on primary cultures of hemocytes from gastropod molluscs, *Haliotis tuberculata*. *Biol. Cell* 86: 67-72.

- Lefebvre, C., Cocquerelle, C., Vandenbulcke, F., Hot, D., Huot, L., Lemoine, Y. y Salzet, M. 2004. Transcriptomic analysis in the leech *Theromyzon tessulatum*: involvement of cystatin B in innate immunity. *Biochemical Journal* 380: 617-625.
- Leighton, D. L. 1974. The influence of temperature on larval and juvenile growth in three species of southern California abalones. *Fish. Bull.* 72(4):1137-1145.
- Leighton, D. L. 1992 Rock Scallop. En *California's Living Marine Resources and their Utilization*. Editado por William S. Leet, Christopher M. Dewees, and Charles W. Haugen, pp. 187-188. University of California, Davis.
- Leighton, D. L. 2000. *The Biology and Culture of the California Abalones*. Dorrance Publishing Co., Pittsburgh, PA. 215 pp.
- Lenarčič, B. y Bevec, T. 1998. Thyropins – new structurally related proteinase inhibitors. *Biol Chem.* 379: 105–11.
- León, C.G., M.C. Rodríguez, J. y R. I. Ochoa B. 1992. Hermafroditismo incidental en el abulón azul *Haliotis fulgens* (Philippi 1845) en una población silvestre en la costa Pacífico de Isla Magdalena, B.C.S. Res. IX Simposium Internacional de Biología Marina. La Paz, B.C.S. Junio de 1992.
- Li, T., Ding, M., Zhang, J., Xiang, J. y Liu, R. 1998. Studies on the pustule disease of abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) on the Dalian coast. *Journal of Shellfish Research* 17: 707–711.
- Liu, P. C., Chen, Y. C., Huang, C. Y. y Lee, K. K. 2000. Virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cultured small abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*, with withering syndrome. *Letters in Applied Microbiology* 31: 433-437.
- Liu, N., Raja, S. M., Zazzeroni, F., Metkar, S. S., Shah, R., Zhang, M., Wang, Y., Brömme, D., Russin, W. A., Lee, J. C., Peter, M. E., Froelich, C. J., Franzoso, G. y Ashton-Rickardt, P. G. (2003), NF- κ B protects from the lysosomal pathway of cell death. *The EMBO Journal*, 22: 5313–5322.

- Li, W-W., Jin, X-K., He, L., Jiang, H., Gong, Y-N., Xie, Y-N. y Wang, Q. 2010a. Molecular cloning, characterization, expression and activity analysis of cathepsin L in chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Fish & Shellfish Immunology* 29: 1010-1018.
- Li, F., Gai, X., Wang, L., Song, L., Zhang, H., Qiu, L., Mengqiang, W. y Siva, V. 2010b. Identification and characterization of a cystatin gene from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Fish Shellfish Immunol.* 29: 521–529.
- Livak, K. J. y Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* 25 (4): 402-408.
- Logan, J., Edwards, K. y Saunders, N. 2009. Real-time PCR: Current Technology and Applications. Horizon Scientific Press. Pp. 284.
- Magister, Š. y Kos, J. 2013. Cystatins in immune system. *Journal of Cancer* 4 (1): 46-56.
- Mottet, M. 1978. A review of the fishery biology of abalones. Wash. dept. Fish. Tech. Rept. No. 37.
- Mydlarz, L. D., Jones, L. E. y Drew-Harvell, C. 2006. Innate immunity enviromental drivers, and disease ecology of marine and freshwater invertebrates. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematic* 37: 251-288.
- Nicolas, J. L., Basuyaux, O., Mazurié, J. y Thébault, A. 2002. *Vibrio carchariae*, a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata*. *Diseases of Aquatic Organisms* 50: 35-43.
- Oliveira, A. S., Xavier-Filho, J. y Sales, M. P. 2003. Cysteine proteinases and cystatins. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 46 (1): 91-104.
- Otto, H.-H. y Schirmeister, T. 1997. Cysteine proteases and their inhibitors. *Chem. Rev.* 97: 133–171.

- Peek, K. y Gabbott, P. A. 1990. Seasonal cycle of lysosomal enzyme activities in the mantle tissue and isolated cells from the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology* 104: 403-412.
- Pessino, C. y Martelotto, L. 2004. Métodos para el estudio de expresión de genes. En: *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*, Edition 1, Chapter: 7(2), Publisher: INTA Press, Buenos Aires, Argentina., Editors: Viviana Echenique, Clara Rubinstein, Luis Mroginsky, pp.229-238
- Premachandra, H. K. A., Wan, Q., Sandaruwan-Elvitigala, D. A., De Zoysa, M., Young-Choi, C., Whang, I. y Lee, J. 2012. Genomic characterization and expression profiles upon bacterial infection of a novel cystatin B homologue from disk abalone (*Haliotis discus discus*). *Development and comparative Immunology*. *In press*.
- Premachandra, H. K. A., Sandaruwan-Elvitigala, D. A., Whang, I., Kim, E., De Zoysa, M., Lim, B-S., Yeo, S-Y., Kim, S., Park, M-A. Park, H-C. y Lee, J. 2013. Expression profile of cystatin B otholog from manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in host pathology with respect to its structural and functional properties. *Fish & Shellfish Immunology* 34 (6): 1505-1513.
- Qiu, R., Liu, X., Hu, Y-h. y Sun, B-g. 2013. Expression characterization and activity analysis of a cathepsin B from Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. *Fish & Shellfish Immunology* 34: 1376-1382.
- Raimondi P. T., Wilson C. M., Ambrose R. F., Engle J. M. y Minchinton T. E. 2002. Continued declines of black abalone along the coast of California: Are mass mortalities related to El Nino events? *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 242, 143–152.
- Ray, D. y Price, J. 2007. A review of the effects on fishery stocks of pathogens released by aquaculture. Victorian Abalone Divers Association Inc, (VADA). Report to the abalone council of Australia. 17 pp.

- Romero, A., Novoa, B. y Figueras, A. 2012. Genomics, immune studies and diseases in vivale aquaculture. *Invertebrate Survival Journal* 9: 110-121.
- Serviere-Zaragoza, E., Navarrete del Toro, M. y García-Carreño, F. 1997. Protein-hydrolyzing enzymes in the digestive systems of the adult Mexican blue abalone, *Haliotis fulgens* (Gastropoda). *Aquaculture* 157: 325-336.
- Shelang, K. M., Arnaud, L., Florence, C., Anne, C. y Serge, P. 2003. Evidence for a direct link between stress and immunity in the mollusk *Haliotis tuberculata*. *J. Exper. Zool.* 295 (A): 136-144.
- Shuhong, W., Yilei, W., Zhaoxia, Z., Jack, R., Zhaohong, W., Zhihua, Z. y Ziping, Z. 2004. Response of innate immune factors in abalone *Haliotis diversicolor supertexta* to pathogenic or nonpathogenic infection. *Journal of shellfish research* 23 (4): 1173-1177.
- Sierra-Rodríguez, P., Muciño-Díaz, M., Gutiérrez-González, J. L. y Turrubiates-Morales, J. R. 2006. La Pesquería de Abulón. En *Sustentabilidad y Pesca Responsable en México: Evaluación y Manejo*. Editado por Arregín-Sánchez, F., Beléndez-Moreno, L., Méndez-Gómez-Humarán, I., Solana-Sansores, R. y Rangel-Dávalos, C. pp. 1-37. INAPESCA. SAGARPA. México.
- Suzuki, T., Higgins, P. J. y Crawford, D. R. 2000. Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques* 29 (2): 332-337.
- Tan, J., Lancaster, M., Hyatt, A., Van Driel, R., Wong, F. y Warner, S. 2008. Purification of a herpes-like virus from abalone (*Haliotis* spp.) with ganglioneuritis and detection by transmission electron microscopy. *Journal of Virological Methods* 149: 338-341.
- Tanaka, R., Ootsubo, M., Sawabe, T., Ezura, Y. y Tajima, K. 2004. Biodiversity and in situ abundance of gut microflora of abalone (*Haliotis discus hannai*) determined by culture-independent techniques. *Aquaculture* 241: 453-463.

- Thellin, o., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A. y Heinen, E. 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology* 75: 291-295.
- Tisca, P. G. y Mosca, F. 2004. Defense mechanisms in farmed marine mollusks. *Vet Res Commun* 28: 57-62.
- Turk, B., Turk, V. y Turk, D. 1997. Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Biol. Chem.* 378: 141–150.
- Turk, V., Stoka, V., Vasiljeva, O., Renko, M., Sun, T. Turk, B. y Turk, D. 2012. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1824: 68-88.
- Tutschulte, T. y Connell, J. H. 1981. Reproductive biology of three species of abalone (*Haliotis*) in southern California. *Veliger* 23:195-206.
- Underhill, D. y Goodridge, H. 2012. Information processing during phagocytosis. *Nature Review Immunology*, 12: 492-502.
- Vargas-Albores, F. y Barrocco, M. 2001. Mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos, con énfasis en pectínidos (en: *Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: ciencia y acuicultura*, ed. Maeda-Martínez, A.). Cap. 7: 127-146.
- Vega-Velázquez, A., León-Ceballos, G. y Muciño-Díaz, M. 1994. Sinopsis del información biológica, pesquera y acuacultural de los abulones (*Haliotis* spp.) de la Península de Baja California, México. *PESCA II*: 118 pp.
- Wan, Q., Whang, I., Young Choi, C., Lee, J-S. y Lee, J. 2011. Validation of housekeeping genes as internal control for studying biomarkers of endocrine-disrupting chemicals in disk abalone by real-time PCR. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 153: 259-268.

- Wang, J., Guo, Z., Feng, J., Liu, G., Xu, L., Chen, B. y Pan, J. 2004. Virus infection in cultured abalone, *Haliotis diversicolor* reeve in Guangdong Province, China. Journal of Shellfish Research 23: 1163–1168.
- Watts, C. 2012. The endosome-lysosome pathway and information generation in the immune system. Biochimica et Biophysica Acta 1824: 14-21
- Zhao, J., Shi, B., Jiang, Q-r. y Ke, C-h. 2012. Changes in gut-associated flora and bacterial digestive enzymes during the development stages of abalones (*Haliotis diversicolor*). Aquaculture 338-341: 147-153.